

**Vergleichende immunhistochemische Untersuchungen
zum LH/hCG-Rezeptor (LHCGR) im Urothel und
Detrusor der Harnblase mit Veränderungen bei Bladder
Pain Syndrome/Interstitial Cystitis (BPS/IC)**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von:

Claudia Schulze, geb. Taube

Geboren am 05.01.1987 in Halle/Saale

angefertigt am:

Universitätsklinikum Leipzig

Betreuer:

Priv.-Doz. Dr. rer. nat. habil. Jochen Neuhaus

Dr. med. Thilo Schwalenberg

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 17.06.2014

Inhaltsverzeichnis

Bibliographische Beschreibung	5
Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	9
1.1. Bladder Pain Syndrome/Interstitial Cystitis (BPS/IC)	9
1.1.1. Definition	9
1.1.2. Pathogenese und Pathophysiologie	10
1.1.2.1. Die fehlende Glykosaminoglykan (GAG)-schicht	11
1.1.2.2. Mastzellaktivierung	11
1.1.2.3. Neurogene Entzündung	12
1.1.2.4. andere Theorien	13
1.1.3. Epidemiologie	13
1.1.4. Allgemeines	14
1.1.5. Klassifikation	15
1.1.6. Symptome	16
1.1.7. Diagnostik	17
1.1.8. Therapie	20
1.2. Das Urothel	22
1.2.1. Gesundes Urothel	22
1.2.2. Veränderungen bei BPS/IC	23
1.3. Luteinizing Hormone/Choriogonadotropin Rezeptor (LHCGR)	24
1.3.1. Lokalisation	24
1.3.2. Genstruktur und Proteinaufbau	24
1.3.3. Regulation	26
1.3.4. Signalweiterleitung	27
1.3.5. Krankheiten	27
1.3.6. Liganden	28
1.3.7. LHCGR in der Harnblase	30
1.4. Zielstellung der Arbeit	31

2. Material und Methoden	32
2.1. Material	32
2.2. Methoden	37
2.2.1. Immunhistochemische Färbung	37
2.2.1.1. Technik der indirekten Immunfluoreszenz	37
2.2.1.2. Durchführung der indirekten Immunfluoreszenz	37
2.2.2. konfokale Laserscanning-Mikroskopie	38
2.2.2.1. Methode	38
2.2.2.2. Aufnahme der konfokalen Bilder	39
2.2.2.3. Auswertung der konfokalen Bilder	40
2.2.3. PCR	43
2.2.3.1. reverse Transkription	43
2.2.3.2. Standard-PCR	43
3. Ergebnisse	45
3.1. Immunhistochemie	45
3.1.1. Urothel	45
3.1.2. Detrusor	56
3.1.3. weitere Lokalisationen des LHCGR	59
3.1.4. statistische Auswertung konfokaler Bilder	61
3.2. PCR	63
3.2.1. Standard-PCR	63
4. Diskussion	65
4.1. Alterskorrelation	66
4.2. Der LHCGR im Urothel	66
4.3. Der LHCGR im Detrusor	75
4.4. Der LHCGR im Stroma und in Gefäßen	78
4.5. Der LHCGR in Bezug zur Pathophysiologie von BPS/IC	79
4.6. Implikationen für therapeutische Anwendung von hCG und LHCGR	83
4.7. Ausblick	85

5. Zusammenfassung	87
Literaturverzeichnis	90
Eigenständigkeitserklärung	103
Lebenslauf	104
Publikationen	104
Danksagung	105

Bibliographische Beschreibung

Schulze, Claudia

Vergleichende immunhistochemische Untersuchungen zum LH/hCG-Rezeptor (LHCGR) im Urothel und Detrusor der Harnblase mit Veränderungen bei Bladder Pain Syndrome/Interstitial Cystitis (BPS/IC)

Universität Leipzig, Dissertation

105 Seiten, 155 Literaturangaben, 23 Abbildungen, 9 Tabellen, 17 Diagramme

Referat:

Der LHCGR (*Luteinizing-Hormone/Choriogonadotropin Rezeptor*) stellt einen typischen zellmembrangebundenen Vertreter der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) dar. Neben seinem physiologischen Vorkommen in den gonadalen Geweben des Menschen (Hoden und Ovar), wird er mit noch unbestimmter Funktion auch extragonadal exprimiert. Diese Arbeit untersuchte das Vorkommen des LHCGR in der menschlichen Harnblase mit Hilfe eines polyklonalen Rabbit-Antikörpers (indirekte Immunfluoreszenz) gegen die C-terminale intrazelluläre Domäne des Rezeptors und mittels Standard-PCR. Vergleiche der Expressionsmuster und – höhe erfolgten geschlechtsspezifisch zwischen 16 BPS/IC (*bladder pain syndrome/interstitial cystitis*)- und 20 tumorfreien Kontrollharnblasen. Nur das weibliche Urothel wies eine signifikant höhere Immunfluoreszenz der BPS/IC-Harnblasen gegenüber den weiblichen Kontrollharnblasen auf. Vergleiche im Detrusor zeigten keine unterschiedlichen Expressionswerte zu den entsprechenden Kontrollen. 5 festgelegte Expressionsmuster des Rezeptors im Urothel und 3 Expressionsmuster im Detrusor variierten stark in Abhängigkeit des Geschlechts und zwischen den Entitäten Kontroll- bzw. BPS/IC-Harnblase. In glatten Muskelzellen schien sich der LHCGR bei gleichbleibender mittlerer Fluoreszenzintensität zu Komplexen zusammenzulagern (Oligomerisierung). Die Standard-PCR unterstützte die gefundene Expression des Rezeptors auf mRNA-Ebene im Urothel und Detrusor der untersuchten Harnblasen. Die Ergebnisse wurden vor dem Hintergrund einer möglichen Beteiligung des Rezeptors an der Pathophysiologie von BPS/IC diskutiert.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
APF	<i>antiproliferative factor</i>
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AUA	<i>American Urological Association</i>
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
bp	Basenpaare
BPS	<i>bladder pain syndrome</i>
BPS/IC	<i>bladder pain syndrome/interstitial cystitis</i>
Bsp.	Beispiel
BSA (Albumin Fraktion V)	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
cAMP	<i>cyclic</i> Adenosinmonophosphat
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary</i> DNA
CI	<i>Confidence Interval</i>
COS-7	<i>Cercopithecus aethiops, origin-defective SV-40</i>
COX	Cyclooxygenase
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
EAU	<i>European Association of Urology</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF(R)	<i>epidermal growth factor</i> (-Rezeptor)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EREhs	<i>Estrogen receptor response element half site</i>
ESSIC	<i>European Society for the Study of Interstitial Cystitis</i>
EZD	Extrazellulardomäne
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMPP	<i>familial male-limited precocious puberty</i>
FSH(R)	Follikelstimulierendes Hormon (-Rezeptor)
GAG	Glykosaminoglykan
GnRH(R)	Gonadotropin Releasing-Hormon (-Rezeptor)
GPCR	<i>G-Protein coupled receptor</i>

GRK	GPCR-Kinase
HB-EGF	<i>heparin-binding EGF-like growth factor</i>
hCG	humanes Choriongonadotropin
HES	humane embryonale Stammzellen
ICA	<i>Interstitial Cystitis Association</i>
ICDB	<i>Interstitial Cystitis Data Base</i>
ICS	<i>International Continence Society</i>
ICSI	<i>Interstitial Cystitis Symptome Index</i>
IgA	Immunglobulin A
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IL	Interleukin
IZD	Intrazellulardomäne
JAR-Zellen	humane plazentare Chorionkarzinomzellen
KCl	Kaliumchlorid
LH	Luteinisierendes Hormon
LHCGR	Luteinizing-Hormone/Choriogonadotropin Rezeptor
LRBP	LHCGR-mRNA Bindeprotein
LRR	<i>Leucin-rich region</i>
LSM	<i>Laser scanning microscope</i>
M	molare Masse [g/mol]
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MAPK/ERK	<i>mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-related kinase</i>
MA-10	Leydig-Tumorzellen der Maus
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIDDK	<i>National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NO	Stickstoffmonoxid
o.ä.	oder ähnliches
OAB	<i>overactive bladder</i>
off-label-use	zulassungsüberschreitende Anwendung
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS	<i>painful bladder syndrome</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PGE	Prostaglandin E
PKA	Proteinkinase A

PLC	Phospholipase C
PLC-Zellen	humane Plazentazelllinie
PNS	peripheres Nervensystem
PUF	<i>Pelvic Pain and Urgency/Frequency Scale</i>
RAS	<i>rat sarcoma</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROI	<i>region of interest</i>
SCF	<i>stem cell factor</i>
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SSW	Schwangerschaftswoche
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS	<i>TRIS buffered saline</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TH2	T ₂ -Helferzellen
TMD	Transmembrandomäne
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSH(R)	Thyreotropes Hormon (-Rezeptor)
TUR-P	Transurethrale Resektion der Prostata
TUTUR	Transurethrale Tumorsektion
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vs.	<i>versus</i>
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung:

1.1. Bladder Pain Syndrome/Interstitial Cystitis (BPS/IC)

1.1.1. Definition

Die Interstitielle Zystitis ist bis heute eines der am schwierigsten zu diagnostizierenden und zu therapierenden Krankheitsbilder in der Urologie. Seit Skene den Begriff 1887 mit den Worten *“when the disease has destroyed the mucous membrane partly or wholly and extended to the muscular parietals, we have what is known as interstitial cystitis”* (1) das erste Mal erwähnte, wurde die Definition viele Male verändert und angepasst. Doch in den letzten Jahren hat sich das Bild der Krankheit grundlegend geändert. Sie gilt nicht mehr als reine entzündliche Endorganerkrankung der Harnblase, sondern vielmehr als chronisches Schmerzsyndrom multifaktorieller Genese (2). Damit ist das Krankheitsbild eher als Teil einer generalisierten somatischen Störung zu begreifen (3), die mit anderen nicht-urologischen Symptomen wie gynäkologischen oder gastrointestinalen Beschwerden assoziiert ist (4).

1987 erarbeitete das *National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases* (NIDDK) eine erste Definition der Interstitiellen Zystitis, die zur Diagnosestellung vor allem klinische Symptome und Ausschlusskriterien heranzog (5). Probleme bei der Anwendung im klinischen Alltag wurden schnell erkannt, denn die Definition war eher zur einheitlichen Erfassung von Studiengruppen erarbeitet worden (2). So konnten etwa 60% der Patienten mit diesen Kriterien nicht identifiziert werden [(6), (7)]. Gründe für die schlechte Sensitivität waren in der Heterogenität der Patientengruppe zu suchen. Beispielsweise entgingen Betroffene mit weniger stark ausgeprägten Miktionssymptomen wie Nykturie oder Harndrang der Erfassung durch die NIDDK-Kriterien (6). 2002 benannte die *International Continence Society* (ICS) die Interstitielle Zystitis in „*Painful Bladder Syndrome*“ (PBS) um. Dabei beschrieb der Begriff einen „suprapubische[n] Schmerz, der mit Füllung der Harnblase einhergeht und der von anderen Symptomen wie z.B. erhöhter Miktionsfrequenz tags und nachts bei Fehlen einer nachgewiesenen Harnwegsinfektion oder anderer offenkundiger Pathologie begleitet wird“ (2). Aber auch diese Definition offenbarte schnell Schwachstellen in der klinischen Anwendung. Rund 1/3 der Interstitielle-Zystitis-Patienten wurden durch die Restriktion auf den suprapubisch lokalisierten Schmerz nicht erkannt [(8), (9)]. Bei Anwendung des Begriffs Beckenschmerz hingegen konnten Warren et al. statt bisher 76% alle ihrer Patienten der Diagnose PBS zuordnen (8). Diese Erkenntnisse spiegelten sich in der neuen Definition der

ESSIC (*European Society for the Study of Interstitial Cystitis*) aus dem Jahr 2007 wider. Sie änderten den Begriff PBS in „*Bladder Pain Syndrome*“ (BPS), das beschrieben wurde als: „*chronic pelvic pain, pressure or discomfort, all perceived to be related to the urinary bladder accompanied by at least one other urinary symptom such as persistent urge to void or urinary frequency*“. Übergangsweise wird aktuell von vielen Autoren das Akronym BPS/IC benutzt (10) und soll so auch in der vorliegenden Arbeit verwendet werden. Verändert hatte sich in der Definition der ESSIC die einschränkende, nur auf die Harnblase bezogene Schmerzlokalisierung (suprapubisch) und der Verzicht auf die Korrelation von vermehrter Blasenfüllung mit zunehmenden Schmerzen. Hier wurde zudem auch zum ersten Mal extrapelvinen Symptomen wie emotionalen und sexuellen Beeinträchtigungen eine Bedeutung als Krankheitskomponente bei BPS/IC beigemessen (10).

Mit der aktuellen Definition der ESSIC konnte der heutigen Ansicht über BPS/IC mehr Rechnung getragen werden. Sie wird zunehmend als Symptomkomplex verschiedener Subgruppen gesehen, die statt der Entzündung der Harnblase heute eher die Schmerzkomponente als gemeinsames Merkmal teilen (11). Deshalb wird BPS/IC nach der EAU (*European Association of Urology*) zur Zeit auch unter die chronischen Beckenschmerz-Syndrome, zu denen ebenfalls Vaginal- oder Prostataschmerzsyndrome zählen, eingliedert (11). Letztlich bleibt die Diagnose aber bis heute eine Ausschlussdiagnose (1).

Die sich ständig verändernden Definitionen sind nicht nur Ausdruck der noch immer unbekannten Ätiologie der Erkrankung, sondern erschweren auch den Vergleich verschiedener Studien miteinander (2).

1.1.2. Pathogenese und Pathophysiologie

Trotz jahrzehnte langer Forschung ist es (bisher) noch nicht gelungen eine weltweit anerkannte Ursache für BPS/IC zu finden, sodass zunächst auch die Therapie hauptsächlich symptomatisch orientiert und experimentell bleiben wird. Viele Theorien zur Pathogenese existieren und sind in kontroverser Diskussion, von denen ich die 3 zentralen im Folgenden näher beschreiben möchte. Andere, weniger gut belegte oder äußerst strittige Theorien, sollen hier nur kurz erwähnt werden.

1.1.2.1. Die fehlende Glykosaminoglykan (GAG)-schicht

Auf der apikalen Zellschicht des Urothels befindet sich ein Schutzfilm aus Proteoglykanen und Glykoproteinen, die zusammen die GAG-Schicht bilden [(12), (13)]. Sie besteht hauptsächlich aus Hyaluronsäure, Heparan - , Chondroitin - und Keratansulfat (2). Durch ihre Fähigkeit viel Wasser binden zu können, hält sie im Urin befindliche Proteasen von den Natriumkanälen der Zellmembran fern. Dieser „Wasserfilm“ senkt außerdem die Konzentration von Salzen und anderer gelöster Stoffe an der Zelloberfläche, um damit die Funktionalität der Ionenpumpen zu verbessern [(12), (14)].

Die GAG-Schicht dient aber nicht nur dem Schutz der Urothelzellen vor dem Konzentrationsunterschied zum Urin, indem es ein Teil der Permeabilitätsbarriere der Zellen darstellt. Sie schützt die Blasenschleimhaut auch vor Adhäsion von Bakterien an die Zellmembranen [(5), (12)]. Studien konnten zeigen, dass bei bis zu 70 % der Patienten mit BPS/IC die GAG-Schicht geschädigt bzw. die Permeabilität des Urothels erhöht war (14). Dabei ist immer noch nicht geklärt, ob dieses Phänomen als Ursache oder Folge der Krankheit betrachtet werden kann (12). Letztlich wird das Urothel für Urinnoxen durchgängig, unter denen man v.a. Kaliumionen eine große Rolle zuschreibt [(13), (15)]. Dieses kann schon in physiologischen Urinkonzentrationen submuköse Nervenfasern (sensorische und motorische) depolarisieren [(16), (17)] und Mastzellen aktivieren. Daraus resultiert die Zerstörung von Blasengewebe, deren Korrelat als Schmerz und erhöhte Miktionsfrequenz von den Patienten wahrgenommen wird [(4), (18)].

1.1.2.2. Mastzellaktivierung

Mastzellen als Entzündungsmediatoren sind schon lange im Blickfeld der Forschung um die Entstehung von BPS/IC. Sie können über spezifische (Substanz P, Zytokine, bakterielle Toxine etc.) und unspezifische Reize wie Stress aktiviert werden [(4), (19)]. Beispielsweise führen Zytokine wie der SCF (*stem cell factor*), die von geschädigtem Urothel produziert werden, zur Degranulierung der Mastzellen. Aber auch das bei BPS/IC verstärkt exprimierte Zytokin NGF (*nerve growth factor*) kann dies bewirken (19). Schließlich werden vasoaktive und inflammatorische Mediatoren freigesetzt, die u.a. die Gefäßpermeabilität erhöhen (Tryptase) oder über bestimmte Rezeptoren zu neuronaler Übererregbarkeit führen (Tryptase), Schmerzen vermitteln (Histamin) oder mittels VEGF (*vascular endothelial growth factor*) die

Gefäße erweitern. Letzteres verursacht die typischen Glomerulationen und die Hypervaskularität in Harnblasenzystoskopen bei BPS/IC (19).

Histologische Untersuchungen wiesen eine höhere Dichte an Mastzellen im Detrusor und der Submukosa von erkrankten Personen im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nach [(5), (19)]. Dieses Merkmal kann jedoch weder als pathognomonisch für BPS/IC gesehen, noch als ausreichendes Differenzierungskriterium bzw. zur Diagnosestellung herangezogen werden (20). Obwohl eine Mastozytose bei 30-65% der Patienten beobachtet wurde (4), zeigte die Infiltrationsdichte keinerlei Korrelation zum Schweregrad der Erkrankung. Sie dient lediglich der Erfassung bestimmter Untergruppen und kann dazu beitragen, die Therapie zu spezifizieren [(2), (5)]. Letztlich bleibt es abzuwarten, wie sich der Stellenwert der Mastzellen in der Diagnostik und Pathogenese von BPS/IC weiter entwickeln wird.

1.1.2.3. Neurogene Entzündung

Es existieren eine Reihe sehr unterschiedlicher Publikationen zu dieser Theorie, denen eine vermehrte Innervation der Harnblase gemeinsam ist. Einige Autoren beschrieben eine verstärkte sympathische Innervation mit Aktivierung von purinergen Neurotransmittern, die Mastzellen aktivieren und so die Entzündungsreaktion auslösen konnten (18). Andere Forschungsgruppen vermuteten eine Sensibilisierung von Mechano- und Chemorezeptoren der Harnblasenwand (17). Auch werden durch die anhaltenden Entzündungsreize neuroplastische Veränderungen im peripheren und zentralen Nervensystem verursacht. Dies umfasst z.B. die Senkung der Schmerzschwelle oder die Bildung neuer Synapsen in den Hinterhörnern der Schmerzbahnen im Sinne eines „neurologic wind-up“ (1). Damit würde sich die Hyperalgesie und die Allodynie von Harnblasen und anderen Beckenorganen bei BPS/IC erklären können, denn Patienten klagen oft auch über gastrointestinale oder gynäkologische Symptome (1). Unterstützend zeigten auch Untersuchungen von Nazif et al., dass die Innervationsdichte in therapierten BPS/IC-Harnblasen geringer war als in nicht behandelten BPS/IC-Harnblasen (17).

1.1.2.4. andere Theorien

Neben möglichen infektiösen (21) oder autoimmunen Einflüssen (20) auf die Entstehung von BPS/IC, wurden auch lokale Hypoxien (22), genetische Einflüsse (23) oder die schädigende Produktion von NO (24) als Ursache der Krankheit diskutiert. Neuere Ansätze untersuchten die Expression verschiedener Rezeptoren im Detrusor von BPS/IC-Patienten, darunter Histamin - (25), purinerge und muskarinerge Rezeptoren (26). Diese wirken auf die Kontraktionsfähigkeit und damit Stabilität der Blasenmuskulatur und beeinflussen so die Symptome von BPS/IC. Durch das Erstellen von individuellen Rezeptorprofilen mittels Biopsieentnahme wäre somit eine patientenspezifische Therapie realisierbar [(26), (27)]. Ebenfalls in Untersuchung befindet sich die Expression von Gap junction – Proteinen wie Cx43, das bei BPS/IC in der glatten Muskulatur der Harnblase, aber auch in Myofibroblasten der Lamina propria verändert ist [(28), (29)].

Alles in allem wurde noch keine Theorie gefunden, die alle Symptome erklärt und als Hauptursache von BPS/IC betrachtet werden kann. Viele der bis heute postulierten Pathogenesen ergänzen und bedingen sich gegenseitig und schließen sich keinesfalls aus. Darum scheint eine multifaktorielle Genese von BPS/IC wahrscheinlicher und jede Theorie hat möglicherweise bei bestimmten Subgruppen ihre Berechtigung. Denn BPS/IC präsentiert sich als sehr heterogenes Spektrum von Patienten und Symptomen (2).

1.1.3. Epidemiologie

Nicht zuletzt wegen dieser Vielfältigkeit ist es schwer, einheitliche epidemiologische Daten zu ermitteln. Sie schwanken stark in Abhängigkeit der Erhebungsweise (Urologen, Patientenfragebögen, Bevölkerungsstichproben) und der zugrunde gelegten Definitionskriterien (30). So gab es Studien in den USA die Prävalenzen von 60/100.000 bis hin zu 865/100.000 Frauen (31) und Inzidenzen von 1-2/100.000 Frauen erhoben haben (30). Insgesamt liegen die Prävalenzen in Europa tendenziell niedriger, eventuell mitbegründet durch die strengerer Diagnosekriterien, die z.B. eine Biopsie zum Ausschluss anderer Krankheiten fordern [(4), (6)]. Eine Studie von 1975 zeigte eine Prävalenz von 18/100.000 Personen (männliche und weibliche) in der finnischen Bevölkerung (6).

BPS/IC betrifft vorwiegend Frauen mit einem Verhältnis von 9-10 Frauen /1 Mann (30). Dabei scheinen die Männer deutlich unterrepräsentiert zu sein, denn in Finnland konnte eine Prävalenz von 3,1/100.000 Männer ermittelt werden (32).

1.1.4. Allgemeines

Der charakteristische Krankheitsverlauf ist durch anfängliche Remissionen und Exazerbationen gekennzeichnet, die nach einem progredienten Verlauf von bis zu 30 Jahren in ein kontinuierliches Stadium übergehen [(15), (33)]. Andere Patienten hingegen zeigen rapide Symptomverschlechterungen oder haben kaum Remissionen (34). Auch die Symptome verändern sich im zeitlichen Verlauf: während zu Beginn noch Harndrang und Miktionshäufigkeit dominieren, nimmt die Schmerzkomponente mit der Zeit immer mehr zu [(17), (35)]. Fast alle Patienten haben Schlafprobleme, viele leiden unter Konzentrationsschwierigkeiten und Partnerkonflikten. Letztlich sind sogar 3 von 4 Patienten teilweise oder permanent arbeitsunfähig (30) und die Lebensqualität ist dementsprechend deutlich vermindert (36).

Experten gehen davon aus, dass nur jeder 5. Patient mit der Krankheit nach 2 bis 4,5-jähriger Laufbahn durch mehrere Arztpraxen diagnostiziert wird (34). Das ursprüngliche Bild vom typischen Patient „postmenopausale Frau“ hat sich mit den Jahren zur Mittvierzigerin gewandelt. Außerdem sind noch mindestens ein Viertel der Frauen jünger als 30 Jahre, wenn ihre Symptome das erste Mal auftreten (30). Männer erkranken in deutlich höherem Alter (Symptombeginn mit durchschnittlich 63 Jahren) und werden meist erst nach Fehldiagnosen wie chronische Prostatitis diagnostiziert (32). Sie entwickeln die typischen Symptome der Pollakisurie oder sexuellen Funktionsstörungen häufig später als Frauen (37). Außerdem sind bislang keine Korrelationen zu Autoimmunerkrankungen bekannt (32), was der geringen Zahl an diagnostizierten Männern und der begrenzten Datenlage von BPS/IC bei Männern geschuldet sein könnte.

Es ist umstritten, ob auch Kinder von BPS/IC betroffen sein können. Allerdings geben erkrankte Frauen 10 mal häufiger als Gesunde an, auch schon in ihrer Kindheit an Blasenproblemen gelitten zu haben (38).

1.1.5. Klassifikation

Früher wurde BPS/IC in eine ulzeröse/klassische Form und eine nicht-ulzeröse/nicht-klassische Form eingeteilt und wird von den meisten Autoren weiterhin so verwendet. Allerdings erfolgt heute die Klassifikation von BPS/IC nach den ESSIC-Kriterien mittels Zystoskopie- und Biopsiebefunden [(39), (Abb. 1)].

Table 1 European Society for the Study of Interstitial Cystitis classification system

Biopsy	Cystoscopy with hydrodistension			
	Not done	Normal	Glomerulations ^a	Hunner's lesion ^b
Not done	XX	1X	2X	3X
Normal	XA	1A	2A	3A
Inconclusive	XB	1B	2B	3B
Positive ^c	XC	1C	2C	3C

Data from Van De Merwe *et al.* [5**].

^a Cystoscopy: glomerulations grade II–III.

^b With or without glomerulations.

^c Histology showing inflammatory infiltrates or detrusor mastocytosis or granulation tissue or intrafascicular fibrosis.

Abb. 1: BPS/IC-Klassifikationssystem nach den ESSIC-Kriterien. BPS/IC wird nach Durchführung von Zystoskopie mit Hydrodistension und Biopsieentnahme in verschiedene Gruppen eingeteilt. Aus (39).

Die klassische Form von BPS/IC wird aufgrund von verminderter Blasenkapazität und Hunner'schen Läsionen in der Harnblasenwand bei Zystoskopien definiert und macht etwa 10% der Patienten aus [(4), (33)]. Histologische Untersuchungen aus diesen Regionen zeigen u.a. eine höhere Dichte an Mastzellen (19), Fissuren mit fehlendem Urothel, suburotheliale Entzündungen mit Perineuritis und Gefäßdilatationen [(40), (41)].

Bei der nicht-ulzerösen Form finden sich in der Zystoskopie Glomerulationen und submuköse Hämorrhagien [(4), (33)]. Glomerulationen galten lange Zeit als charakteristisches Merkmal bei BPS/IC (40). Mittlerweile sind sie aber auch bei Frauen nach Tubenligatur, nach intravesikaler Chemotherapie (6) oder bei Männern nach einer TUR-P beschrieben worden (39). Damit stellen sie heute kein pathognomonisches Zeichen bei BPS/IC mehr dar, zumal es auch Patientengruppen mit ausgeprägten Symptomen ohne typische Glomerulationen gibt (42). Histologisch zeigen sich bei der nicht-klassischen Form Urothelrupturen mit umschriebenen suburothelialen Ödemen und Teleangiektasien in der Lamina propria [(40), (41)].

Neuere Einteilungen beschränken sich nicht auf die Histologie, sondern ziehen molekularbiologische Marker zur Beschreibung von Patientensubgruppen heran. Mit Hilfe von Biopsien aus allen Wandschichten der Harnblase ermöglichen so erstellte Rezeptorprofile neben einer besseren Einsicht in die Pathogenese von BPS/IC auch eine sehr spezifische Therapie (41).

1.1.6. Symptome

Patienten mit BPS/IC haben einen großen Leidensdruck. Das zentrale Symptom ist der Schmerz [(7), (39)], der dumpf oder brennend sein kann und sich auf verschiedene Regionen projiziert. Einige Patienten fühlen ihn suprapubisch im Bereich der Harnblase, bei anderen breitet er sich auf Urethra und Vagina, sogar bis in die Leiste oder die Rektalregion aus [(1), (35)]. In den meisten Fällen beginnt er schon bei geringer Füllung der Harnblase und wird als Hinweis auf veränderte sensorische Afferenzen verstanden (17). Er verstärkt sich bei zunehmenden Urinmengen und verschwindet kurzzeitig bei Blasenentleerung (11). Je nach Studie finden sich auch Patientenpopulationen, die vorrangig von Harndrang oder Pollakisurie betroffen sind. Eine dritte Patientengruppe leidet wiederum sowohl an Schmerzen als auch an Blasensymptomen [(6), (9)]. Problematisch ist die subjektive Einstellung der Patienten zum Schmerz, die es erschwert eine einheitliche Erfassung der Betroffenen zu gewährleisten. Einige Patienten empfinden die Schmerzen eher als Druck oder unangenehmes Gefühl und werden von Fragebögen nicht erfasst (35). Andererseits trugen auch kulturelle Unterschiede dazu bei, dass bisher keine international gültige Definition erarbeitet werden konnte. Beispielsweise empfanden über die Hälfte der befragten japanischen BPS/IC-Patienten keinen Blasenschmerz (39).

Ein weiteres Symptom bei BPS/IC ist die steigende Miktionsfrequenz, die sich meist langsam zu einer Pollakisurie (≥ 8 Miktionen/Tag) entwickelt [(2), (15)]. Teilweise berichten Patienten über bis zu 15 Miktionen am Tag (15).

Das dritte Charakteristikum ist der persistierende Harndrang, der vor allem die Schmerzen lindern soll [(2), (15)]. Wichtig ist hier die Abgrenzung zu anderen Schmerzsyndromen wie OAB (*overactive bladder*), da hier der Harndrang mit Inkontinenz und nicht mit Schmerzen assoziiert ist [(35), (43)].

Viele Patienten klagen auch über andere Symptome in Zusammenhang mit den Beschwerden bei BPS/IC. Darunter Nykturie (35), Dyspareunie (15), verminderte Libido (39) und Probleme beim Beginn der Blasenentleerung (35). Außerdem ist BPS/IC auch häufig mit anderen Krankheiten vergesellschaftet wie Reizdarmsyndrom, Endometriose, Fibromyalgie oder Chronisches Erschöpfungssyndrom (1). Symptome können sich perimenstruell (19), aber auch durch Stress, Geschlechtsverkehr, bestimmte Nahrungsmittel wie Zitrusfrüchte und Alkohol oder durch zu enge Kleidung verschlechtern [(15), (35)].

1.1.7. Diagnostik

Die fortbestehende Unsicherheit bezüglich der Definitionskriterien und die Komplexität der Symptome machen es dem unerfahrenen Arzt sehr schwer die Diagnose „BPS/IC“ zu stellen. Lange Jahre war BPS/IC als „hysterische Frauenkrankheit“ (34) bekannt und wird noch heute oft von Fehleinschätzungen begleitet. Immer wieder werden die Symptome der Betroffenen als Blasenschwäche oder sogar Schmerzneurose fehlgedeutet (22). Männer werden eher mit einer abakteriellen Prostatitis oder Prostatodynie diagnostiziert, bevor ein Arzt an BPS/IC denkt [(6), (32)]. Darum müssen auch andere Fachrichtungen wie die Gynäkologie oder Gastroenterologie mit dem Krankheitsbild vertraut gemacht werden, da sich viele Patienten mit ihren Symptomen zuerst dort vorstellen (4). Wichtig ist letztlich nach einer ausführlichen Anamnese die Krankheit in Betracht zu ziehen und die Symptome der Betroffenen ernst zu nehmen.

Das diagnostische Dilemma besteht in den fehlenden pathognomonischen Zeichen und der widersprüchlichen Datenlagen zu den bekannten Markern. **Abb. 2** zeigt die Empfehlungen der EAU zu Diagnosestellung und Therapie von BPS/IC (11).

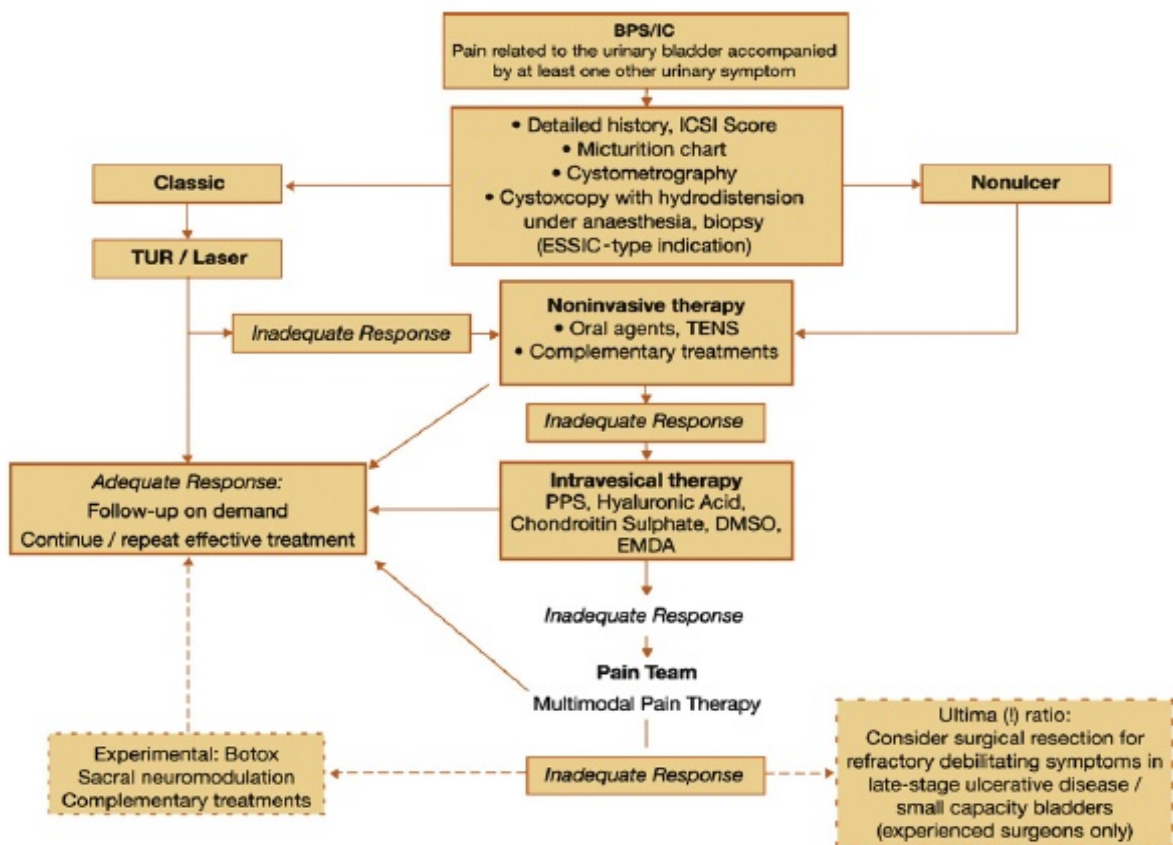


Abb. 2: Flowchart zur Diagnostik und Therapie von BPS/IC nach der EAU. Diese Abbildung zeigt die einzelnen Schritte auf dem Weg zu einer gesicherten Diagnose von BPS/IC und die daraus folgenden Therapiemaßnahmen. BPS/IC = bladder pain syndrome/interstitial cystitis; DMSO = dimethyl sulfoxide; EMDA = electromotive drug administration; ESSIC = European Society for the Study of Interstitial Cystitis; ICSI = Interstitial Cystitis Symptom Index; PPS = pentosan polysulfate sodium; TUR = transurethral resection. Aus (11).

- Zystoskopie:

In Europa ist zur Diagnosestellung eine Zystoskopie mit Hydrodistension üblich, um Ein- und Ausschlusskriterien wie Harnblasenkarzinome zu erfassen und die Krankheit in verschiedene Stadien einzuteilen. Nach den NIDDK-Kriterien fällt bei Zystoskopien von Patienten mit BPS/IC eine Anfälligkeit der Blasenmukosa, also Einrisse oder submuköse Blutungen, auf (18). Jedoch konnte für kein Zeichen (Glomerulationen o.ä.) eine ausreichende Spezifität für BPS/IC oder eine Korrelation zu typischen Symptomen gefunden werden (42). Bei einigen Patienten wirkt sich die Hydrodistension sogar positiv auf die Symptome aus: 20-30% berichten über eine Verbesserung für 3-6 Monate nach dem Eingriff (6).

- Biopsie:

Biopsien sind zwar für die Diagnosestellung nicht zwingend, dennoch haben sie in Europa einen hohen Stellenwert zum Ausschluss von Differentialdiagnosen und zur Klassifikation von BPS/IC [(6), (44)]. Beispielsweise gilt eine Mastozytose oder Fibrose im Detrusor, wenn auch nicht als Beweis, so doch als Hinweis auf eine (Interstitielle) Zystitis (2). Die Biopsie kann histopathologische Aspekte der Krankheit erfassen und könnte zukünftig helfen über molekularmedizinische Verfahren Patientensubgruppen zu spezifizieren. Dies könnte auf Grundlage individueller Rezeptorprofile eine gezieltere und patientenspezifischere Therapie von BPS/IC ermöglichen [(26), (27)].

- Urinmarker:

Seit der Entdeckung von signifikant im Urin von BPS/IC-Patienten veränderten Parametern war die Hoffnung groß, endlich einen pathognomonischen, noch dazu nichtinvasiven Marker entdeckt zu haben. Jedoch ist bisher kein Urinmarker prospektiv bei BPS/IC untersucht worden [(4), (6)]. Zunächst konnten mastzelltypische Produkte wie Histamin und seine Metaboliten im Urin identifiziert werden (6). Später entdeckte man eine Abnahme von Glykosaminoglykanen wie GP 51 im Urin von BPS/IC – Patienten, das mit einer Sensitivität von nur 58% ebenfalls nicht ausreichend für eine Diagnosestellung ist (14). Neue Studien konzentrierten sich auf APF (*antiproliferative factor*), EGF (*epidermal growth factor*) und HB-EGF (*Heparin-binding EGF-like growth factor*) als vermeintlich spezifische Zeichen bei BPS/IC. APF wird vom Blasenepithel selbst produziert und zeigt eine wachstumshemmende Wirkung auf gesunde Urothelzellen (45). Trotz der hohen Sensitivität und Spezifität (95% und 94%) dieses Markers (46), müssen größere Studien mit einer höheren Anzahl an ähnlichen Krankheitsbildern die Aussagekraft erst noch bestätigen. Bisher scheint APF lediglich die Wachstumshemmung des Urothels zu belegen. Und schließlich müssen diese Marker auch noch prospektiv an einem größeren Patientenkollektiv getestet werden.

Urinanalyse und –kultur sollen andere Ursachen der BPS/IC-Symptome, z.B. Hämaturie oder Harnwegsinfekte, ausschließen (21).

- Urodynamik:

Auch diese Untersuchung hilft eher BPS/IC von anderen ähnlichen Syndromen abzugrenzen als es zu identifizieren. Die Zystometrie ist gut geeignet, um Blasenentleerungsstörungen durch Obstruktionen oder eine OAB auszuschließen (47). Patienten mit BPS/IC zeigen bei der

Untersuchung meist eine verminderte maximale Blasenkapazität und haben im Vergleich zu Gesunden geringere Volumina bei allen klinischen relevanten Messpunkten, wie der Empfindung des ersten Harndrangs oder der ersten Füllung. Dabei ist jedoch keines dieser Kriterien zur Diagnostik von BPS/IC geeignet (47).

- Andere Untersuchungsmethoden:

Miktionstagebücher helfen dem behandelnden Arzt eine Übersicht über die vorrangigen Symptome zu erhalten (42). Fragebögen wie der *O'Leary-Sant Interstitial Cystitis Symptom Index* (ICSI) oder die *University of Wisconsin Interstitial Cystitis Scale* sind zwar nicht zur Diagnose von BPS/IC geeignet, aber dennoch zur Erfassung von Symptomen und zur Bewertung des Therapieerfolgs hilfreich (2). Ein positiver KCl-Test (Parson Test) belegt nur einen Epitheldefekt wie er auch bei radiogener Zystitis oder einem HWI vorkommt und ist damit nicht hinreichend spezifisch für BPS/IC (2).

Keine dieser diagnostischen Methoden ist in ausreichendem Maß geeignet die Diagnose BPS/IC zu stellen. Vielmehr ist das Zusammenspiel von klinischen Symptomen und Untersuchungsergebnissen hinweisend auf eine mögliche Erkrankung an BPS/IC.

1.1.8. Therapie

Ist die Diagnose einmal gestellt, stellt sich die schwierige Frage der geeigneten Therapie. Binder et al. geben dazu eine ausführliche Übersicht über mehr als 40 mögliche Optionen mit mehr oder weniger guten Ergebnissen (48). Da bisher noch keine Ursache für BPS/IC bekannt ist, erfolgt die Behandlung vorwiegend symptomorientiert und experimentell. Problematisch ist dabei, dass derzeit nur 2 Medikamente von der FDA (Food and Drug Administration) zur Behandlung von BPS/IC zugelassen sind (49) und somit ein hoher Anteil an Patienten *off-label* therapiert werden.

- Orale Therapie:

Heparin kann sowohl oral als auch intravesikal eingesetzt werden. Es verbessert den Aufbau der GAG-Schicht und kann nach längerfristiger Anwendung die gestörte Permeabilität des Urothels wieder herstellen [(15), (18)]. Pentosanpolysulfat, ein Heparinoid, hat zusätzlich noch antiadhäsive Effekte, die die Wasserbindefähigkeit der Mukosa im Sinne eines

„Coating-Effekt“ verstärken (48). Es ist das einzige von der FDA zugelassene orale Medikament für BPS/IC (49). Zwischen 40-60% der Patienten profitieren von Antidepressiva wie Amitriptylin (34), das vorwiegend die Schmerzen und den Harndrang verbessert. Zusätzliche antihistaminerge und anticholinerge Wirkkomponenten verbessern auch die Miktionshäufigkeit und erleichtern das Einschlafen durch sedierende Effekte [(15), (48)].

Andere eingesetzte Medikamente sind beispielsweise Antihistaminika wie Hydroxyzin (4), Anticholinergika gegen den Harndrang und die Pollakisurie (15) oder das muskelrelaxierende L-Arginin (48).

- Intravesikale Therapie:

Neben den oben erwähnten GAG-Ersatzstoffen kommt vor allem DMSO (Dimethylsulfoxid) zur Anwendung (18), das als einziges intravesikales Medikament durch die FDA zugelassen ist (49). Es zerstört die Kollagenfasern der Harnblase und bedingt eine chemische Zystitis. Dadurch werden die Schmerzfasern überstimuliert und die Empfindlichkeit der Harnblase auf Schmerzreize verringert. Zusätzlich wirkt DMSO auch analgetisch, antiinflammatorisch und relaxierend (48). Andere Medikamente, die verwendet werden sind Botulinumtoxin A zur Muskelrelaxation (18) oder BCG (Bacillus-Calmette-Guerin), das über eine Entzündungsreaktion Zytokinmuster verändert (50).

Neuere Medikamente wie Resiniferatoxin (39) oder RDP58 (18) sind eher Ausdruck der noch immer unzureichenden und unbefriedigenden Therapie als ernstzunehmende kausale Behandlungsansätze.

- Andere Therapieoptionen:

Zusätzlich können Verhaltenstherapien zur Stressreduktion und Änderung der Ernährungsgewohnheiten eingesetzt werden. Außerdem werden vereinzelt Biofeedback oder Akupunktur angewandt, wobei die Erfolge eher gering sind [(1), (15)].

Hydrodistensionen (42) und Laserbehandlungen (48) der Harnblase können bei einigen Patienten die Schmerzen lindern. Als Therapieoption der letzten Wahl hilft einigen Betroffenen nur noch eine Operation an der Harnblase. Gute Ergebnisse zeigt die supratrigonale Zystektomie bei Patienten mit der klassischen, ulzerösen Form. Rössberger et al. konnten bei 94% der operierten Patienten eine Symptomfreiheit erreichen. Dennoch

wurden gerade bei der nicht-ulzerösen Subgruppe trotz Entfernung der gesamten Harnblase weiterbestehende Schmerzen beobachtet (51).

Zusammenfassend ist kaum eine Therapie mit gut validierten Studien belegt (2) und meist an Patienten in fortgeschrittenen Stadien erprobt worden (15). Der multifaktoriellen Entstehung der Krankheit geschuldet, sollte die Therapie immer nach individuellem Ansprechen mit mehreren Therapieoptionen erfolgen (4). Die *American Urological Association* (AUA) veröffentlichte dazu im Juni 2011 eine Aufstellung über die verschiedenen Evidenzgrade der diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten (43).

1.2. Das Urothel

Da sich meine Versuche hauptsächlich auf das Urothel als wichtige Komponente der (Patho)physiologie der Harnblase konzentrieren (12), möchte ich im Folgenden genauer auf Aufbau und Funktion eingehen.

1.2.1. Gesundes Urothel

Das Urothel entwickelt sich als mindestens 5-schichtiges Übergangsepithel aus dem Endoderm (52) und besteht aus 3 Zelltypen (53): den Basalzellen, aus denen durch Fusion Intermediärzellen gebildet werden und den Umbrellazellen, die aus der Fusion von Intermediärzellen entstehen. Entlang dieser Differenzierungsreihe bildet sich ein Größengradient mit den Umbrellazellen als größte Zellen des Urothels aus (52). Diese sind maßgeblich an der Permeabilitätsbarriere der Harnblase gegenüber dem Urin beteiligt. Zum einen bilden sie eine dichte wasserreiche Schicht durch die Glykoproteine und Proteoglykane (GAG-Schicht) auf ihrer Oberfläche (14). Zum anderen machen sie das Urothel durch Uroplakin-Plaques (spezialisierte Proteine des Urothels), Tight junctions und aktive Ionenpumpen impermeabel (52). Damit ist dessen Hauptaufgabe gesichert, die Zusammensetzung des Urins unverändert zu belassen (52), die Permeation von Kalium-, Ammonium- oder Harnstoff-Ionen in die Blasenwand (54) und die Adhäsion von Bakterien zu verhindern (12). Allerdings erfüllt das Urothel noch andere wichtige Aufgaben der Signalverarbeitung (beispielsweise Dehnungs-, Schmerzreize oder Informationen zur Urinzusammensetzung zu vermitteln) oder der Sekretion von Transmittern wie NO und ATP [(55), (56)].

1.2.2. Veränderungen bei BPS/IC

Der Aufbau des Urothels bei BPS/IC zeichnet sich bei fortgeschrittener Erkrankung durch eine starke Abflachung der Zellschichten aus. Je nach Ausprägung kann die Schleimhaut an einigen Stellen völlig denudiert, also ohne Urothelzellen vorliegen [(33), (54)]. Die Größendifferenzierung entlang der Zellschichten ist meist aufgehoben, sodass alle Zellen die gleiche Größe aufweisen (54). Suburotheliale Blutungen führen zum Aufreißen der Schleimhaut, die in der Zystoskopie als Glomerulationen sichtbar sind und bei zunehmender Krankheitsschwere verschorfen (41).

Umbrellazellen zeigen einen Verlust von luminalem Chondroitinsulfat (57) und im Elektronenmikroskop sind die Interstitialräume zwischen den Epithelzellen erweitert (20).

Die urothelialen Verteilungsmuster bestimmter Markermoleküle wie E-Cadherin oder ZO-1 sind bei BPS/IC als Hinweis auf eine fehlerhafte Differenzierung des Urothels verändert [(12), (57)]. Auf der anderen Seite ist eine verringerte Expression von IL1- α oder TNF- α . Ausdruck einer abnormalen Urothelzellaktivierung (33).

Andere Merkmale des Urothels bei BPS/IC sind die Überexpression von NGF mit konsekutiver Verstärkung der Harnblaseninnervation (12), verringerte Proliferationsraten *in vitro* (45) und die erhöhte Produktion von NO (24), APF (46) und Neurotransmittern (21).

Eine Korrelation der Symptome zu histologischen Merkmalen der BPS/IC-Harnblasen zeigen u.a. größere Schmerzen und stärkere Nykturie bei steigendem Grad der Urothelschädigung (40).

Als Tiermodell gilt für viele Forschungsgruppen die Interstitielle Zystitis der Katze (*feline interstitial cystitis*). Dort finden sich in der Umbrellazellschicht teilweise aufgelöste Zell-Zell-Kontakte (Tight-junctions) und eine Abflachung des apikalen Zellreliefs, deren Korrelat eine Verarmung an Uroplakin-Plaques zu sein scheint (58).

1.3. Luteinizing Hormone/Choriogonadotropin Rezeptor (LHCGR)

Der erstmalige Nachweis von hCG (*humanes Choriongonadotropin*) im Urothel gesunder Harnblasen und seine veränderte Expression bei BPS/IC lassen auf eine regulative Rolle des Hormons in der Urothelregeneration schließen (59). Für hCG sind bereits wachstumsfördernde Eigenschaften und differenzierende Effekte auf verschiedene Gewebe beschrieben worden [(60), (61), (62)]. Darum untersucht diese Arbeit die urotheliale und muskuläre Verteilung des zugehörigen Rezeptors, des LHCGR, in gesunden und an BPS/IC erkrankten Harnblasen.

1.3.1. Lokalisation

Der LHCGR ist klassischerweise in den Gonaden zu finden. Männern exprimieren den Rezeptor in den Leydigzellen des Hodens, in denen er die Synthese von Testosteron steuert [(63), (64)]. Bei Frauen vermittelt er die Ovulation und stimuliert die Androgenproduktion in den Granulosa-, Luteal-, Theka- und Interstitialzellen des Ovars [(64), (65)]. Durch unterschiedliche Glykosylierungsgrade ist der testikuläre Rezeptor größer als der ovarielle LHCGR (66).

1986 gelang im Uterus von Schweinen der erste Nachweis des Rezeptors in einem nichtgonadalen Gewebe (67). Seither konnte der LHCGR in vielen verschiedenen menschlichen Geweben wie Haut, Prostata (68), Haarfollikeln (69), Plazenta (70), Schilddrüse (71), Nebenniere (72) oder in Tumoren wie Leiomyomen und Nebennierenadenomen detektiert werden (67). Andere adulte Gewebe, beispielsweise Leber, Niere oder Lunge (67) scheinen im Gegensatz zum korrespondierenden fetalen Gewebe (73) keinen Rezeptor zu exprimieren.

1.3.2. Genstruktur und Proteinaufbau

Der LHCGR ist als G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR) [(74), (75)] Mitglied der größten Genfamilie des menschlichen Genoms, die mit über 800 Genen (76) etwa 1% der DNA ausmacht (77). Charakteristisch ist der Aufbau aus einer einzelnen Aminosäure-Kette, die eine N-terminale Extrazellulärdomäne (EZD), 7 α -helikale Transmembrandomänen (TMD)

und die C-terminale Intrazellulardomäne (IZD) bildet [(74), (75)]. Jedoch unterscheidet sich der LHCGR von anderen typischen GPCR sowohl durch seine große EDZ, die statt der sonst üblichen TMD die Liganden bindet, als auch durch die Komplexität seiner Liganden selbst (78).

Das Gen des Rezeptors liegt auf Chromosom 2p21 und umfasst mit etwa 80 kbp 11 Exons und 10 Introns [(79), (80)]. Verschiedene Transkriptionsstartseiten liegen bis 1000 bp upstream des ersten Exons und kodieren verschiedene mRNA-Trankripte (81).

Das gebildete Protein [(Abb. 3), (82)] besteht aus insgesamt 699 AS, die sich auf 25 AS für das Signalpeptid, 333 AS für die EZD, 265 AS für die TMD und die restlichen 76 AS für die IZD verteilen (79).

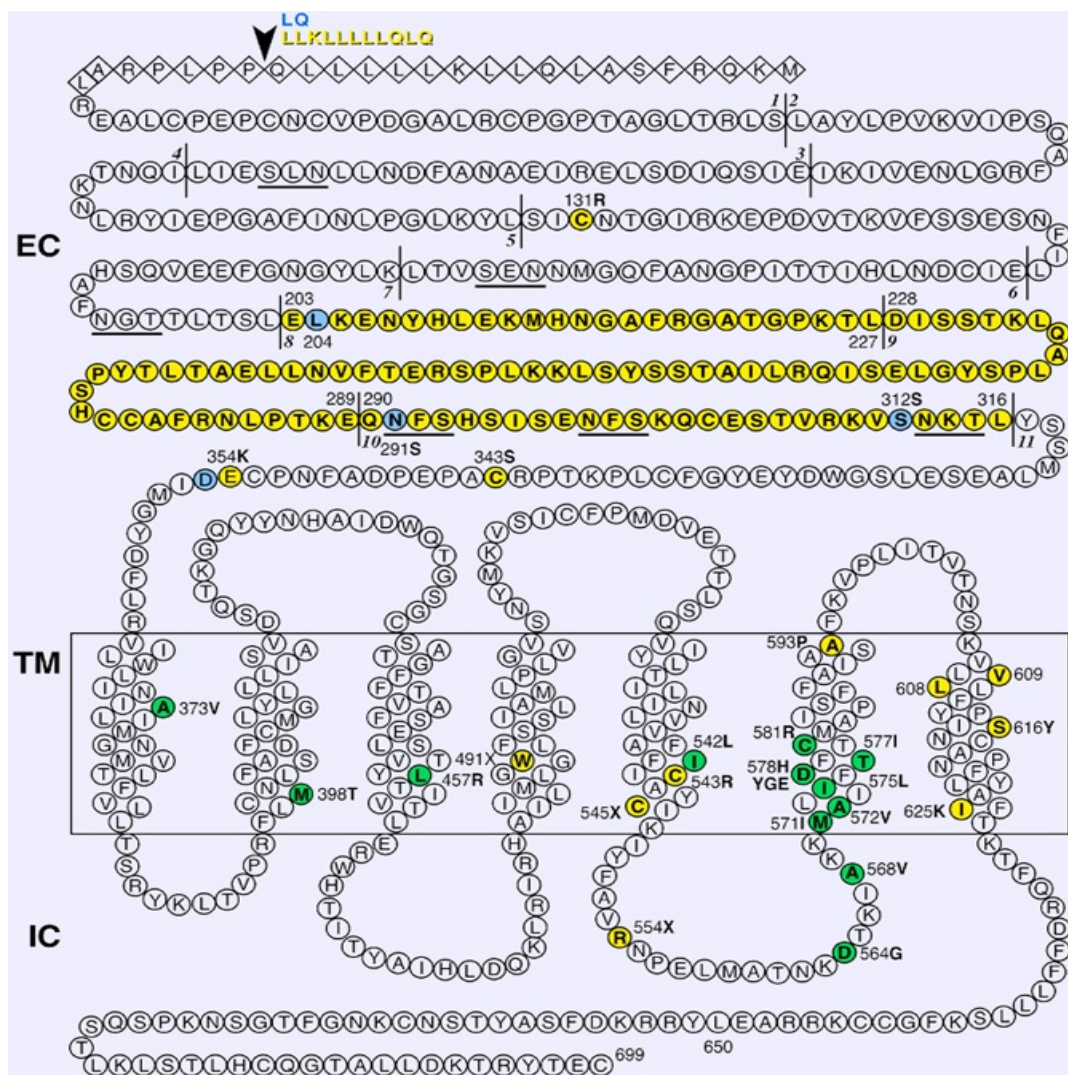


Abb. 3: Primärstruktur des LHCGR. EC: Extrazellulärdomäne, TM: Transmembrandomäne, IC: Intrazellulärdomäne, Kästchen kodieren das Signalpeptid, vertikale Linien markieren Exongrenzen, unterstrichene Aminosäuren zeigen potentielle Glykosylierungsstellen. Aus (82).

Die EZD wird von Exon 1-10 und den ersten 42 AS von Exon 11 gebildet. Die TMD bildet alternierend 3 intrazelluläre (IZ) und 3 extrazelluläre (EZ) Loops (79). IZ-Loop 2 und 3 scheinen nach Rezeptoraktivierung ihre Position zueinander zu verändern und dadurch die Interaktion mit dem G-Protein zu verbessern, das an die IZD gebunden ist [(76), (77)].

Durch posttranslationale Modifikationen an 6 möglichen Glykosylierungsstellen der EZD und Palmitoylierung von Cysteinresten (83) oder Phosphorylierungen von Serinen und Threoninen (79) in der IZD, entsteht der reife Rezeptor mit einer Größe von 80-90 kDa (71). Der Palmitinrest ist wahrscheinlich in der Zellmembran verankert und bildet zwischen sich und dem Beginn der IZD einen vierten intrazellulären Loop (79).

1.3.3. Regulation

Es gibt verschiedene Wege der Desensitivierung der Zelle gegenüber den Liganden. Zum einen kann der LHCGR über das Entkoppeln vom G-Protein entfunktionalisiert werden. Diese Art der Regulierung erfolgt sehr schnell und wird über die Phosphorylierung durch GPCR-Kinasen (GRK) vermittelt (79). Zum anderen gibt es den wesentlich langsameren Weg der down-Regulierung. Durch die Phosphorylierung von Serin - und Threoninresten durch die PKA besitzen diese AS-Reste eine höhere Affinität zu β -Arrestin, das nach Komplexbildung mit dem Rezeptor als *scaffold*-Molekül für andere Signalmoleküle wirkt. Die so gebildeten *Clathrin-coated pits* werden schließlich internalisiert [(79), (84)]. Der in den Endosomen befindliche Rezeptor hat nun 2 Möglichkeiten: entweder er wird im Lysosom abgebaut oder er kann zur Zellmembran zurückgeführt und dort erneut eingebaut werden (84). Welcher Weg überwiegt, hängt zum einen vom Phosphorylierungs - und Palmitoylierungsgrad des LHCGR ab, zum anderen scheinen spezifische Strukturelemente der IZD darauf Einfluss zu haben (84). Beispielsweise wird der LHCGR der Ratte vorwiegend abgebaut, während der humane Rezeptor eher recycelt wird (79). Ist der Rezeptor nicht palmitoyliert, steigt die Internalisierungsrate an und der Rezeptor findet häufiger den Weg zu den Lysosomen (85). Andererseits kann die down-Regulierung auch zu einem geringen Teil (~ 20%) über verminderte mRNA-Level ablaufen (86). Dazu wird v.a. die mRNA abgebaut und nur wenig über die Transkriptionsrate reguliert.

Die Desensitivierung des LHCGR erfolgt nach Exposition von präovulatorisch hohen Dosen LH (*Luteinisierendes Hormon*) oder hohen Dosen hCG, die z.B. durch Tumore wie Chorion-

Karzinome verursacht werden [(71), (87)]. Durch geringe Dosen LH wird der Rezeptor hochreguliert (71), ebenso wie durch die Wirkung von FSH, Östrogen oder bestimmten Wachstumsfaktoren (88).

1.3.4. Signalweiterleitung

Der LHCGR ist ein Rezeptor mit „*multiple signaling potential*“ [(89), (90)]. Damit leitet er das Signal über verschiedene G-Proteine und andere Mechanismen weiter. Der Hauptanteil der Signalweiterleitung nach Ligandenbindung geschieht über Gs-Proteine. Dadurch steigt die cAMP-Konzentration und die PKA wird aktiviert, die zur Transkriptionsregulation anderer Gene führt (79). Andererseits kann der LHCGR auch Gi- und Gq-Proteine aktivieren [(79), (91)], dafür sind aber sehr hohe Konzentrationen von hCG/LH und/oder eine hohe Rezeptordichte in der Zellmembran notwendig (89). Interessanterweise kann der Rezeptor die PLC über die $\beta\gamma$ -Untereinheit von Gs- und Gi-Proteinen aktivieren (91). In MA-10 – (92) oder HES-Zellen (90) kann auch die MAPK/ERK-Kaskade durch den LHCGR ausgelöst werden. Shiraishi et al. konnten sowohl eine cAMP-abhängige (über PKA und RAS) als auch eine cAMP-unabhängige (über Fyn) Aktivierung von MAPK/ERK nachweisen (93).

1.3.5. Krankheiten

Inaktivierende Mutationen des LHCGR führen bei Männern zur Leydigzellhypoplasie. Abhängig vom Restfunktionszustand der mutierten Rezeptorform variiert das Krankheitsbild vom Hypogonadismus bis hin zur fehlenden Leydigzelldifferenzierung mit *Pseudohermaphroditismus masculinus* (männlicher Karyotyp bei weiblichem Phänotyp), je nach der noch produzierten Menge an Testosteron. Ursächliche Mutationen können verschiedene Strukturen betreffen: sie reichen von Mutationen der EZD mit beeinträchtigter Ligandenbindung über trunkierte Rezeptorformen, die hauptsächlich intrazellulär verbleiben bis hin zu fehlenden Rezeptorproteinen [(94), (95)]. Auch bei Frauen lösen solche Veränderungen einen hypergonadotropen Hypogonadismus aus, der körperlich zunächst keine Auffälligkeiten zeigt, aber mit primärer Amenorrhoe bis Infertilität und veränderten primären Geschlechtsmerkmalen einhergeht [(96), (97)].

Auf der anderen Seite führen aktivierende Mutationen des LHCGR zum Krankheitsbild der Testotoxikose (*FMPP=familial male-limited precocious puberty*) mit hohen Konzentrationen von Testosteron. Diese bedingen eine vorzeitige Pubertät vor dem 4. Lebensjahr mit Peniswachstum und Entwicklung der Schambehaarung (95). Anders als die inaktivierenden Mutationen, konzentrieren sich die aktivierenden Mutationen auf wenige Bereiche im Exon 11 (97). Diese sind in anderen Glykoproteinhormonrezeptoren konserviert und lassen eine entscheidende Rolle für die biologische Aktivität des Rezeptors vermuten (96).

Neben den beschriebenen Keimbahnmutationen existieren in Leydigzelladenomen somatische aktivierende Mutationen des LHCGR. Die auch hier resultierende Leydigzellhyperplasie führt zur vorzeitigen Pubertät, deren Eintritt zwischen dem 5.-9. Lebensjahr allerdings später als bei der Testotoxikose liegt [(97), (98)].

1.3.6. Liganden

Der LHCGR bindet sowohl LH als auch hCG. Beide Hormone gehören wie auch TSH und FSH zur Glykoproteinhormonfamilie. Allen Hormonen gemeinsam ist die identische α -Kette, während die β -Kette die jeweilige Spezifität der Hormone ausmacht. Beide Ketten sind nicht kovalent miteinander verbunden und gemeinsam zur Rezeptoraktivierung erforderlich (99). Damit kann die β -Kette allein keine Signaltransduktion auslösen, genauso wie unvollständig posttranslational modifizierte Hormone den Rezeptor nicht aktivieren können (78). Die β -Ketten von hCG und LH stimmen in 81% überein (100), unterscheiden sich also nur durch 24 AS im C-Terminus (101). hCG besitzt eine 4-5 fach höhere Bindungsaffinität zum LHCGR als LH (102).

- LH:

Dieses Hormon wird vom Hypophysenvorderlappen in pulsatilen Rhythmen freigesetzt (103). Die dadurch stimulierte Testosteronproduktion der Leydigzellen sorgt für die Virilisierung und den Beginn der Spermatogenese im Mann (101).

Bei Frauen sorgt der präovulatorische LH-Anstieg für die Ovulation und die Östrogen- und Progesteronproduktion des *Corpus luteum menstruationis* (64).

- hCG:

Produziert wird hCG von Synzythiotrophoblasten der Plazenta (104). Es stimuliert die Progesteronproduktion des *Corpus luteum gravidarum* im ersten Trimenon, um die Schwangerschaft aufrecht zu erhalten (85). Dabei übt es auch wichtige Funktionen in der mütterlichen Immuntoleranz gegenüber dem Fetus aus (102). Zudem trägt es bei männlichen Feten zur Geschlechtsdifferenzierung bei, da hCG dessen Testosteronproduktion stimuliert (85). Außerdem scheint das Schwangerschaftshormon weitere vielfältige trophische Effekte zu besitzen. Es wird unter anderem von verstärktem Blutfluss und gesteigerter Angiogenese im Endometrium, verbesserter Implantation und Einfluss auf die Trophoblastendifferenzierung berichtet [(67), (105)]. Da es auch in vielen fetalen Geweben (u.a. Niere, Lunge oder Thymus) exprimiert wird, könnte hCG differenzierende und wachstumsfördernde Eigenschaften in diesen Organen ausüben (73).

Unabhängig von seiner Wirkung in der Schwangerschaft, wird hCG auch von bestimmten Tumoren produziert. So bilden klassischerweise Keimzelltumoren wie Chorion-Karzinome oder Ovarialtumore (104) hohe Dosen des intakten Hormons (106). Epitheliale Tumoren wie Lungen-, Mamma-, Kolorektale- oder Pankreastumore bilden hingegen nur β -hCG (60). Typischerweise produzieren auch Transitionalzelltumore der Harnblase in höheren Konzentrationen β -hCG (107). Wegen der leichten Bestimmbarkeit aus Urin oder Blut und der hohen Spezifität wurde β -hCG als Tumor- und prognostischer Marker für Harnblasenkarzinome etabliert (104). Die ektope Produktion von β -hCG ist beispielsweise mit geringerer Differenzierung und Radioresistenz des Tumors assoziiert (107). Es gibt aber auch Studien, die in der β -hCG Produktion ein Epiphänomen der Harnblasentumore sehen und sie nicht für klinisch relevant halten (100).

Interessanterweise konnte β -hCG-mRNA im gesunden Urothel nachgewiesen werden [(59), (105)] und auch normale Urothelzellkulturen produzieren β -hCG (100). Das Wachstum von Harnblasentumorzelllinien kann durch β -hCG stimuliert werden, während das intakte Hormon keinen Einfluss ausübt (100). Deshalb scheint die β -Kette von hCG über parakrine oder autokrine Wachstumsfaktoreigenschaften zu verfügen (107), die auch unter anderen Umständen wie bei BPS/IC entfaltet werden könnten.

hCG hat aufgrund seiner vielfältigen neu entdeckten Wirkungen den Status eines reinen Schwangerschaftshormon verloren, zumal es schon 1987 (108) auch bei Männern, u.a. in Prostata und Hoden entdeckt wurde (109).

1.3.7. LHCGR in der Harnblase

Trotz des Vorkommens von β -hCG in Harnblasentumoren gab es bisher keine Studie, die den LHCGR in diesen Tumoren nachweisen konnte, auch nicht in Harnblasentumorzelllinien (60). Die neueste Veröffentlichung von Zaravinos et al. vom April 2011 untersuchte Expressionsmuster bei Blasentumoren. Dabei konnten sie eine starke Verminderung der LHCGR-Expression nachweisen (110), die das Fehlen bisheriger Rezeptornachweise erklären könnte.

Der bis heute einzige Nachweis des LHCGR in der (tumorfreien) Harnblase der Frau wurde 1998 von Tao et al. erbracht. Die Expression des Rezeptors zeigte sich sowohl im Urothel als auch im Detrusor und in den Blutgefäßen in allen untersuchten Teilen der Harnblase (Blasendach, Trigonum und Blasenwände). Nach der Menopause stellte sich der Rezeptor vermindert dar, weshalb die Autoren eine Rolle in der Entwicklung der postmenopausalen Inkontinenz vermuteten (111). Auch an Hunden wurden mit diesem Hintergrund Experimente durchgeführt. Die ermittelte höhere LHCGR-Expression korrelierte in inkontinenten Hunden mit verminderter Blasenkontraktilität (112) oder geringeren urethralen Verschlussdrücken (113). Auch in männlichen Hunden wurde der LHCGR beschrieben (112). Bisher gibt es keine Publikation, die den Rezeptor in humanen männlichen Harnblasen detektieren konnte.

1.4. Zielstellung der Arbeit

Untersuchungen zur Expression von hCG und dessen Isoformen in der humanen Harnblase werden am Universitätsklinikum Leipzig von Dr. Thilo Schwalenberg und Dr. habil. Jochen Neuhaus bereits durchgeführt. Mit dem Hintergrund einer potentiellen Rolle von hCG als Einflussfaktor auf die Epithelregeneration, wird sein Vorkommen im Urothel von gesunden Harnblasen erforscht und mit defektem Urothel am Beispiel von BPS/IC-Harnblasen verglichen. In diese Untersuchungen reiht sich die vorliegende Arbeit ein und stellt parallel dazu den LHCGR als Rezeptor des hCG in der Harnblase dar. Die Expression des LHCGR im Urothel und Detrusor von gesunden und an BPS/IC erkrankten Patienten soll mittels konfokaler Immunfluoreszenzanalyse semiquantitativ untersucht und das Verteilungsmuster des Rezeptors erfasst werden, um eine mögliche Bedeutung für die Pathogenese und Pathophysiologie von BPS/IC aufzuzeigen. Das vertiefte Verständnis der Funktion des LHCGR in der Harnblase ist eine wesentliche Voraussetzung für die Entwicklung neuer Therapiestrategien.

2. Material und Methoden:

2.1. Material

Gewebe für immunhistochemische Färbungen und PCR wurde aus Zystektomien, Nephrektomien (Ureteren), TUTUR und diagnostischen Blasenbiopsien zum einen in der Klinik und Poliklinik für Urologie der Universitätsklinik Leipzig entnommen, zum anderen mit freundlicher Genehmigung von Dr. med. Heinrich Schulte-Baukloh, St. Hedwig Krankenhaus in Berlin, bereitgestellt.

Für immunhistochemische Färbungen wurde das entnommene Gewebe intraoperativ in 4%igem Formalin für 2-4 Stunden fixiert und nach folgendem Programm im Einbettautomaten behandelt: je 2 Stunden 70%iger Ethanol, 96%iger Ethanol, absoluter Ethanol, Xylol, und 3 Stunden Paraffin. Danach wurden die Gewebestücke in der Gewebeausblockstation in Paraffin gegossen und am Mikrotom 7 µm dicke Schnitte angefertigt.

Für die PCR vorgesehenes Gewebe wurde intraoperativ in RNAlater Stabilisierungspuffer gegeben und zur RNA-Isolierung mit Proteinase K-Verdau und RNeasy Mini KIT behandelt.

Patienten mit BPS/IC (LSM: n=16, Standard-PCR: n= 4) sind nach den ESSIC-Kriterien diagnostiziert worden (10). Ausgeschlossen wurden Patienten mit intravesikaler Therapie wie Botoxinjektionen oder Chondroitinsulfatinstillationen. Als Kontrollgruppen (LSM: n=20, Standard-PCR: n=10) dienen tumorfreie Gewebeproben.

Die Primer für die Standard-PCR sind mit dem Programm Primer3 (Version 0.4.0) erstellt und mittels Primer-BLAST von NCBI auf ihre Spezifität überprüft worden.

Tabelle 1: verwendete Reagenzien

Reagenz	Hersteller
2x Master Mix M7502 für PCR	Promega, Mannheim
10x Blue juice	Invitrogen, Karlsruhe
70%iger Ethanol	Hollborn & Söhne, Leipzig
96%iger Ethanol	Hollborn & Söhne, Leipzig
Absoluter Ethanol	Hollborn & Söhne, Leipzig
Agarose	Peqlab Biotechnologie, Erlangen

<i>Aqua dest.</i>	Hauseigene Anlage, Uniklinikum Leipzig
BSA	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA	Sigma Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Formalin (4%)	Fischer, Saarbrücken
Magermilchpulver	Appli Chem, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	VWR, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Paraffin	MEDIM, Giessen
PCR-Standard 1.500 bp	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K-Verdau	Qiagen, Hilden
RNAlater Stabilisierungspuffer	Qiagen, Hilden
TO-PRO 3	Invitrogen, Karlsruhe
TRIS	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim
Xylol	J.T.Baker, Niederlande
Zitronensäure	VWR, Darmstadt

Tabelle 2: verwendete Kits

Kit	Hersteller
Master Mix Superscript VILO	Invitrogen, Karlsruhe
RNeasy Mini KIT	Qiagen, Hilden

Tabelle 3: verwendete Materialien

Material	Hersteller
Confocal-Matrix	Mikro-tech-lab, Österreich
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Fettstift PAP PEN	Immunotech, Frankreich

Immersionsöl	Carl Zeiss, Jena
Objektträger	Menzel, Braunschweig
Tubes für PCR	Sarstedt, Nürnberg

Tabelle 4: genutzte Geräte

Gerät	Hersteller
Dampfgarer „MultiGourmet“	Braun, Kronberg
Einbettautomat DDM-P801	MEDIM, Gießen
Elektrophoresekammer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Elektrophorese-Netzteil Power Pac HV	Bio-Rad, München
Gelgießvorrichtung PCR	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Gewebeausblockstation DDM-P006/II	MEDIM, Gießen
Trockenschrank Modell 400	Memmert, Schwabach
LSM Pascal 5	Carl Zeiss, Jena
Mastercycler realplex ²	Eppendorf, Hamburg
Mikrotom SM 200R	Leica, Wetzlar
Mikrowelle Mikromat	AEG, Nürnberg
Objektiv Plan-Apochromat 63x/1.4Oil	Carl Zeiss, Jena
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator „Dark Hood DH-40/50“ mit Dunkelhaube und Kamera Fujitsu Siemens	
„Pocket Loox N 520“	Biostep, Jahnsdorf
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Schweiz
Waage AB304-S	Mettler Toledo, Gießen

Tabelle 5: Puffer und Lösungen

<u>Citratpuffer 0,01M</u>	9 ml Stammlösung A (21,01 g/l Zitronensäure) 41 ml Stammlösung B (29,41 g/l Natriumcitrat) Auf 500 ml mit <i>Aqua dest.</i> auffüllen und pH=6,0 einstellen
---------------------------	---

<u>10x PBS 0,1M</u>	90 g Natriumchlorid 10,9 g Dinatriumhydrogenphosphat 3,2 g Natriumdihydrogenphosphat Auf 1 l mit <i>Aqua dest.</i> auffüllen und pH=7,4 einstellen Zum Gebrauch 1:10 mit <i>Aqua dest.</i> verdünnen
<u>10x TBS 0,5M</u>	61 g TRIS 90 g Natriumchlorid Auf 1 l mit <i>Aqua dest.</i> auffüllen und pH=7,6 einstellen Zum Gebrauch 1:10 mit <i>Aqua dest.</i> verdünnen
<u>50x TAE Puffer</u>	121 g TRIS 28,6 ml Essigsäure 50 ml EDTA (0,5 M) Auf 500 ml mit <i>Aqua dest.</i> auffüllen Zum Gebrauch 1:20 mit <i>Aqua dest.</i> verdünnen
<u>Block-Lösung</u>	10 ml TBS 10 µl Triton X-100 300 mg Magermilchpulver 100 mg BSA
<u>1,5%iges Agarosegel</u>	200 ml TAE Puffer 3 g Agarose 12 µl Ethidiumbromid
<u>Master Mix Superscript VILO</u>	4 µl 5x VILO Puffer 2 µl 10x Enzym 4 µl <i>Aqua dest.</i>

Tabelle 6: verwendete Antikörper

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Mouse anti- α smooth muscle actin, monoklonal, IgG2a	1:2000 mit Blocklösung	Sigma-Aldrich, USA
Rabbit anti-LHCGR, polyklonal	1:200 mit α -Aktinlösung	Acris, USA

Sekundärantikörper

Goat-anti-mouse, 1:500 mit TBS Mo Bi Tec, USA
Alexa Fluor[®] 488

Goat-anti-rabbit, 1:500 mit TBS Mo Bi Tec, USA
Alexa Fluor[®] 555

Kernfärbung

TO-PRO 3 1:750 mit TBS Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 7: verwendete Primer

Spezifität	Sequenz	Größe [bp]
β-Aktin	5'-CTG GCA TCG TGA TGG ACT CCG G-3'	379
	3'-GTG GAT GCC ACA GGA CTC CAT G-5'	
Cytokeratin 7	5'-CAG GAT GTG GTG GAG GAC TT-3'	186
	3'-TGA GGG TCC TGA GGA AGT TG-5'	
α-Aktin	5'-CCA ACT GGG ACG ACA TGG AAA-3'	212
	3'-GCG TCC AGA GGC ATA GAG AGA CA-5'	
LHCGR	5'-CTC AAT GTG GTG GCC TTC TT-3'	158
	3'-GAG ATA GGT GCC ATG CAG GT-5'	

Tabelle 8: PCR-Daten

Primer	Annealing-Temperatur [°C]	Zykluslänge
β-Aktin	67	40
Cytokeratin 7	57	40
α-Aktin	62	35
LHCGR	58	45

2.2. Methoden

2.2.1. Immunhistochemische Färbung

2.2.1.1. Technik der indirekten Immunfluoreszenz

Der Primärantikörper bindet spezifisch an das Antigen, der Sekundärantikörper ist gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet und mit einem Fluorochrom markiert. Durch Anregung mittels Laserlicht emittiert dieser Farbstoff Licht einer definierten Wellenlänge (**Abb. 4**).

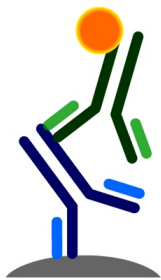


Abb. 4: Schematische Darstellung der indirekten Immunfluoreszenz. Primärantikörper (blau) bindet an das gesuchte Epitop, der Sekundärantikörper (grün) bindet an den Fc-Teil des Primärantikörpers. Gelb: konjugierter Farbstoff zur Detektion des Sekundärantikörpers (aus (114)).

2.2.1.2. Durchführung der indirekten Immunfluoreszenz

Gewebeschnitte wurden zunächst bei 60°C für 30 Minuten getrocknet und zum Entparaffinieren für je 10 Minuten 2 mal in Xylol gegeben. Die sich anschließende absteigend konzentrierte alkoholische Reihe (absoluter Alkohol, 96%iger Alkohol und 70%iger Alkohol für je 5 Minuten) diente zur Rehydrierung. Nachfolgend wurden die Präparate 5 Minuten mit *Aqua dest.* gespült, um den restlichen Alkohol auszuwaschen. Alle Schnitte, in 0,01M Citratpuffer (**Tabelle 5**) überführt, kamen bei 100°C für 40 Minuten in einen Dampfgarer und wurden dann zum Abkühlen bei Raumtemperatur entnommen. Nach 30 Minuten schloss sich ein Waschschriff mit PBS für 10 Minuten an. Mit einem Fettstift erfolgte die separate Umrandung aller auf einem Objektträger befindlichen Gewebeschnitte, um bei anschließenden Färbeschritten ein Verlaufen der aufgetragenen Flüssigkeiten zu verhindern. Nach den folgenden 2 Waschschriffen mit TBS für je 5 Minuten, schloss sich für weitere 15 Minuten die Behandlung mit einer Block-Lösung (**Tabelle 5**) zur Verhinderung von unspezifischen Bindungen (BSA) und zur Permeabilisierung der Zellmembran (Triton X-100)

an. Danach wurden die primären AK (**Tabelle 6**) aufgebracht, wobei Kontrollschnitte nur mit α -Aktin gefärbt wurden. Zur Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Objektträger in eine feuchte, abgedunkelte Box gelegt, um eine mögliche Austrocknung während der nächsten Stunden zu verhindern.

Am nächsten Tag wurden die Präparate zunächst gewaschen (3x TBS für je 10 Minuten), um dann mit sekundären Antikörpern (**Tabelle 6**) für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert zu werden. Nach weiteren 3 Waschschritten gleicher Art (3x 10 Minuten mit TBS) wurden die Zellkerne bei Raumtemperatur mit TO-PRO 3 angefärbt. 45 Minuten später schlossen sich 3 weitere 5 minütige Spülschritte mit TBS und ein letzter mit *Aqua dest.* für ebenfalls 5 Minuten an. Dieser abschließende Schritt soll durch Puffersalze gebildete Kristalle auswaschen, bevor die histologischen Schnitte endgültig mittels Confocal-Matrix eingedeckt wurden. Die Aufbewahrung aller Objektträger erfolgte lichtgeschützt bei 4°C, um ein Ausbleichen des Farbstoffs zu vermeiden.

2.2.2. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

2.2.2.1. Methode

Durch Laserlicht einer spezifischen Wellenlänge kann der verwendete Farbstoff zum fluoreszieren angeregt werden. Der Laser fokussiert dabei nur ein sehr kleines Areal und „tastet“ sich Punkt für Punkt in der x- und y-Achse über den ausgewählten Bildbereich. Um die Auflösung in der z-Achse zu erhöhen, sorgt eine Lochblende (konfokale Blende, *Pinhole*) dafür, dass Lichtstrahlen über und unterhalb der Fokusebene ausgeblendet werden. Die emittierte Fluoreszenzintensität wird mit einem Detektor (*Photomultiplier*) gemessen und schließlich werden die einzelnen Punkte am Computer zu einem Bild zusammengesetzt. Durch Verschiebung in der z-Achse kann so auch ein 3 dimensionales Bild rekonstruiert werden (**Abb. 5**).

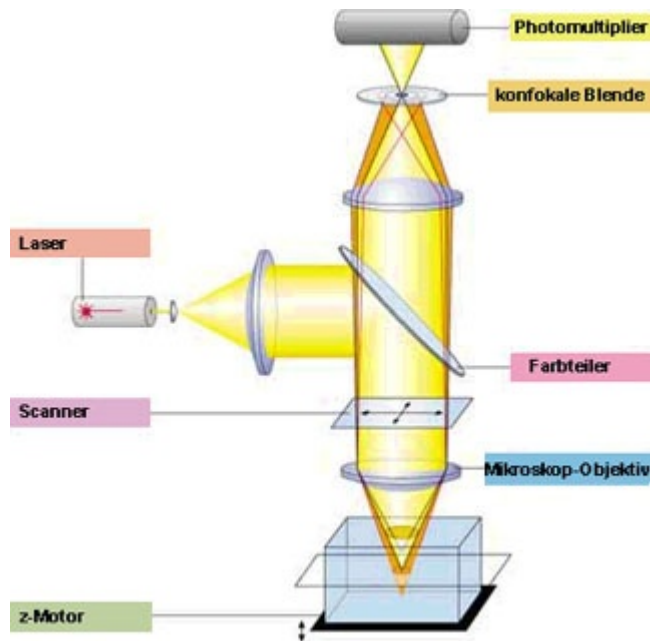


Abb. 5: Aufbau des LSM. Laserlicht wird über Spiegel auf die Objektebene projiziert und regt den verwendeten Farbstoff zum Leuchten an. Emittiertes Licht wird über eine konfokale Blende, die die Streustrahlung verringert, mit einem Detektor (Photomultiplier) gemessen und am Computer zu einem Bild verarbeitet. Über den z-Motor erfolgt die Feinjustierung der Fokusebene in der z-Achse (aus (115)).

2.2.2.2. Aufnahme der konfokalen Bilder

Zur Reinigung der Objektträger wurden sie mit einem in 70%igem Ethanol getränkten Tuch gesäubert und ein Tropfen Immersionsöl auf die Präparate aufgetragen. Mit dem Plan-Apochromat 63x/1.4Oil -Objektiv wurden die interessierenden Bereiche am Präparat aufgesucht und bei gleichbleibenden Aufnahmeeinstellungen (Pinhole blau und grün: 104µm, Pinhole rot: 108µm) Bilder aufgenommen.

Von jedem Präparat wurden jeweils mindestens 5 Bilder von Urothel und Detrusor aufgenommen sowie auch von deren Kontrollfärbungen, sodass insgesamt wenigstens 20 Bilder pro Präparat zur Auswertung zur Verfügung standen.

2.2.2.3. Auswertung der konfokalen Bilder

Alle Bilder wurden mit Image J 1.42q ausgewertet. Dazu wurden von Urothelaufnahmen jeden Präparats 35 Rechtecke (*region of interest* = *ROI*) quer zu den Urothelschichten gelegt (**Abb. 6**).

Zu beachten war die etwa gleiche Breite der ROIs und der Ausschluss von großen Defekten innerhalb der Urothelzellschichten.

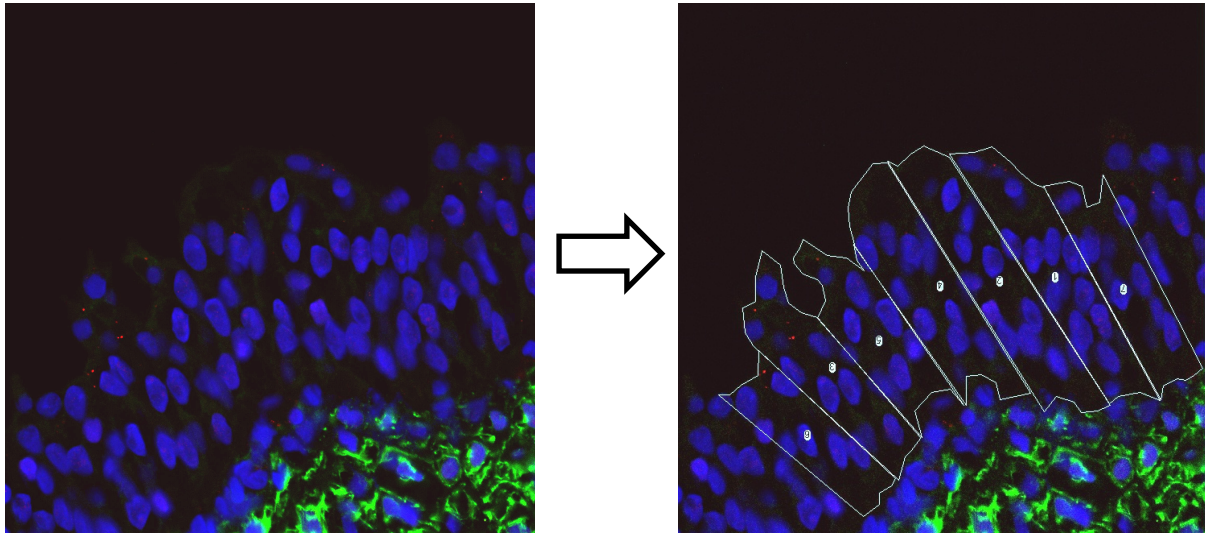


Abb. 6: Auswertung der Urothelaufnahmen. Links-unbearbeitetes Bild, rechts-bis zu 10 Bereiche senkrecht zu den Urothelschichten werden definiert (ROIs = regions of interest).

In den ausgewählten Bereichen (ROIs) wurde von Rezeptor- und Kontrollfärbungen eines Präparates für jeden Pixel die Fluoreszenzintensität (0-255) des LHCGR-Signals (roter Kanal) in einem Diagramm gemittelt (Histogramm 1 und 2). Der prozentuale Anteil der mittleren Fluoreszenzintensität jeden Bereichs an der Gesamtfluoreszenz wurde berechnet und von dem jeweiligen Histogrammfeld abgezogen. Aus der resultierenden Verteilung (lila) berechnet sich der Mittelwert jeden Präparats. Dieser wurde zum Vergleich der verschiedenen Präparate miteinander verwendet (**Abb. 7**).

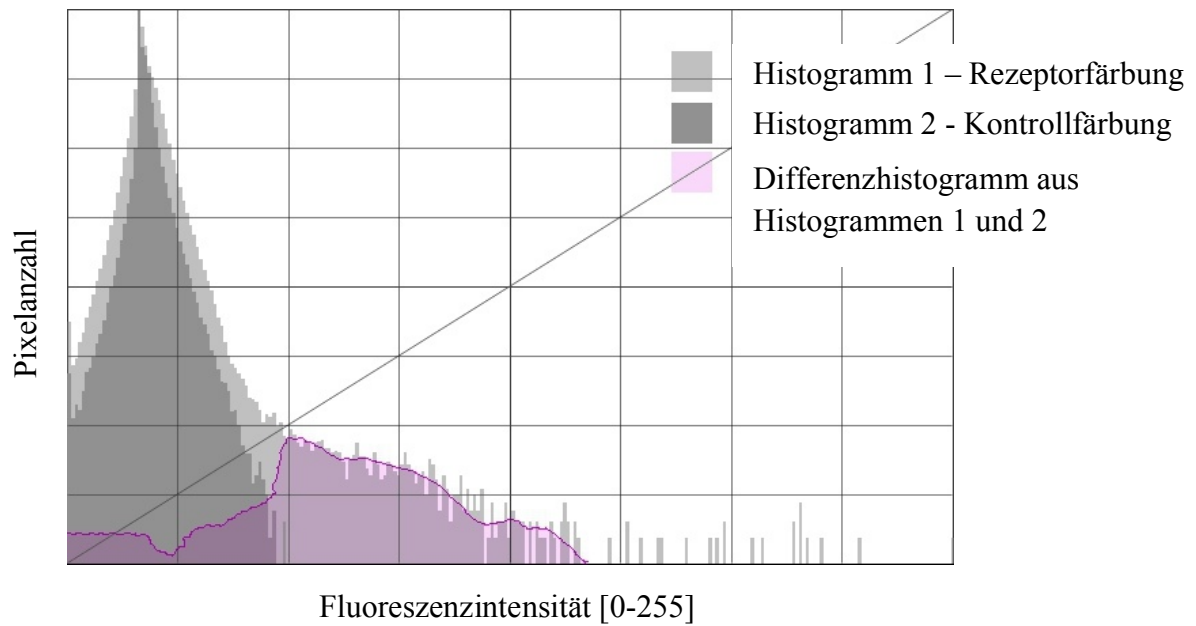
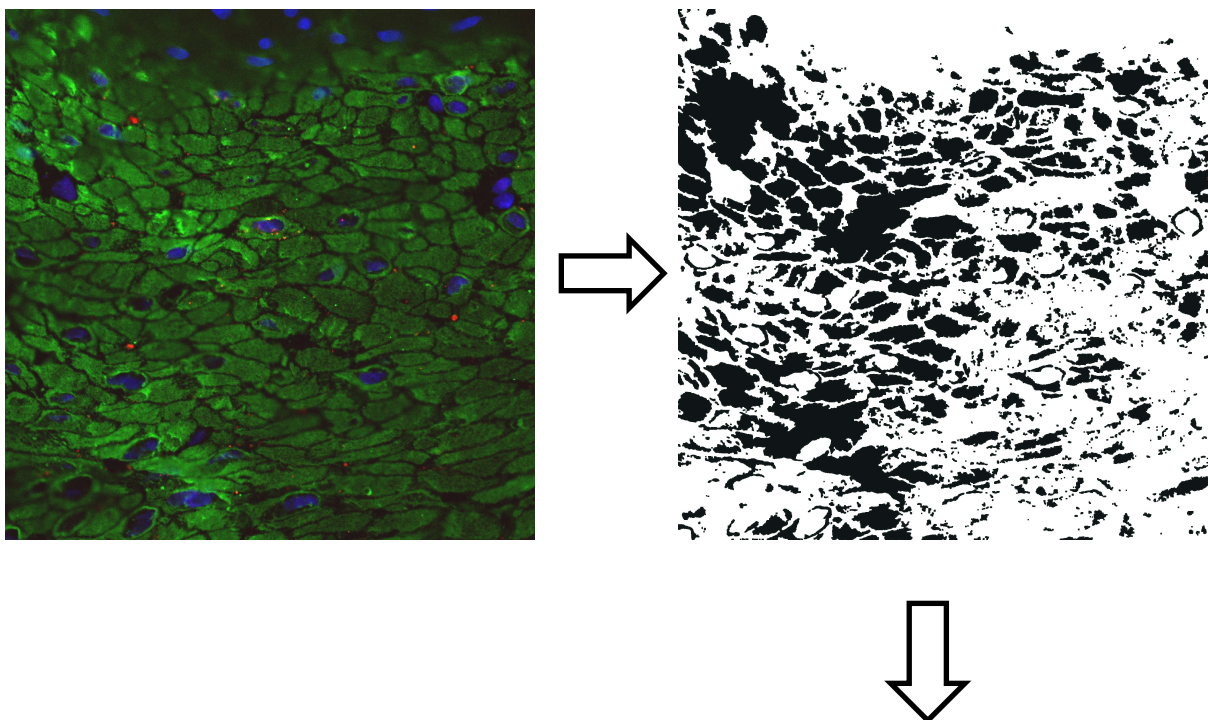


Abb. 7: Histogramm zur quantitativen Auswertung der konfokalen Bilder. Anzahl der Pixel in den verschiedenen Fluoreszenzintensitäten (0-255) wird als Histogramm für die Rezeptorfärbung (entweder gesunde Harnblase oder BPS/IC-Harnblase) und die jeweilige Kontrollfärbung (kein Primärantikörper) dargestellt. Aus dem nach Subtraktion beider Verteilungen resultierenden Histogramm (lila) wird die mittlere Fluoreszenzintensität ermittelt. Diese Werte jeden Präparats werden nun miteinander verglichen.

In den Detrusorbildern wurden 35 Zellen zufällig durch Konvertierung in schwarz-weiß-Fotos ausgewählt, um eine Beeinflussung durch die Fluoreszenzintensität zu vermeiden (**Abb. 8**).



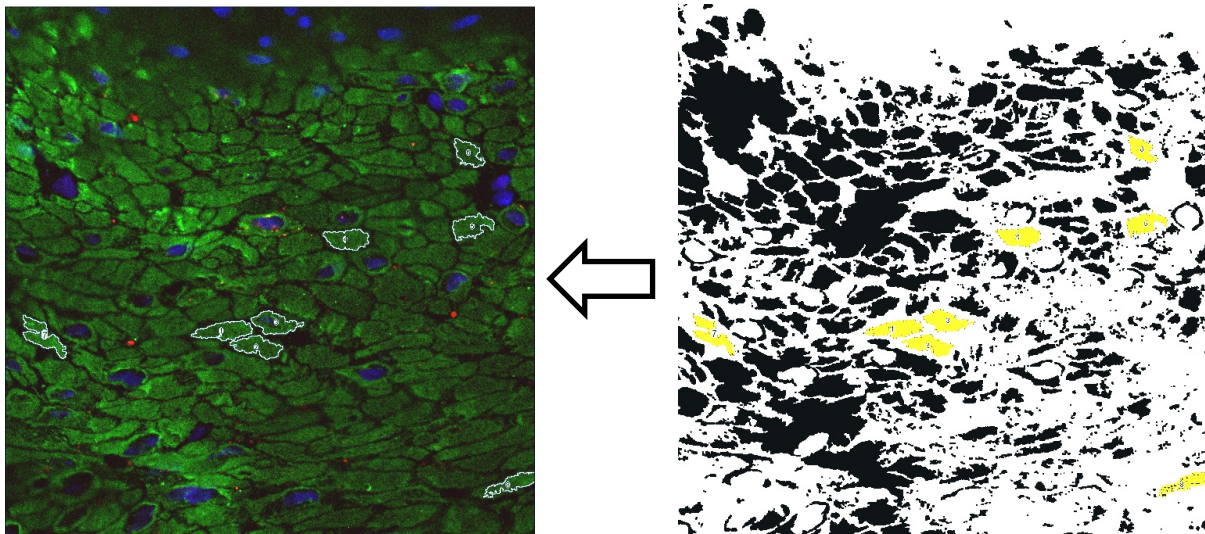


Abb. 8: Auswertung der Detrusoraufnahmen. Oben links-unbearbeitetes Bild, oben rechts-Konvertierung der Zellen in schwarz/weiß-Darstellung, unten rechts-zufällige Auswahl von bis zu 10 Muskelzellen, unten links-Rekonvertierung zum ursprünglichen Bild, das nun die ausgewählten Zellen enthält.

Bei der Auswahl der Zellen wurde darauf geachtet, dass sie keine großen Anschnitte von Zellkernen oder stark unterschiedliche Größe aufwiesen.

Auch hier erfolgte die Messung der einzelnen Intensitäten pro Pixel und die Bestimmung der Mittelwerte analog zu den Urothelbildern.

Zur Auswertung der Rezeptorcluster wurde zuerst für alle Bilder ein einheitlicher Schwellenwert festgelegt. Die Immunfluoreszenz des Rezeptors im roten Kanal wird in μm^2 am Gesamtbild gemessen und über 5 Bilder eines Präparats gemittelt. Rezeptorpunkte über $1\mu\text{m}^2$ wurden als Verunreinigung definiert und ausgeschlossen (**Abb. 9**).

Die statistische Analyse aller Bilder erfolgte mittels Mann-Whitney-Test, wobei eine Signifikanz für $p < 0,05$ angenommen wurde. Die so erhaltenen Werte wurden im Programm GraphPad Prism 5 dargestellt.

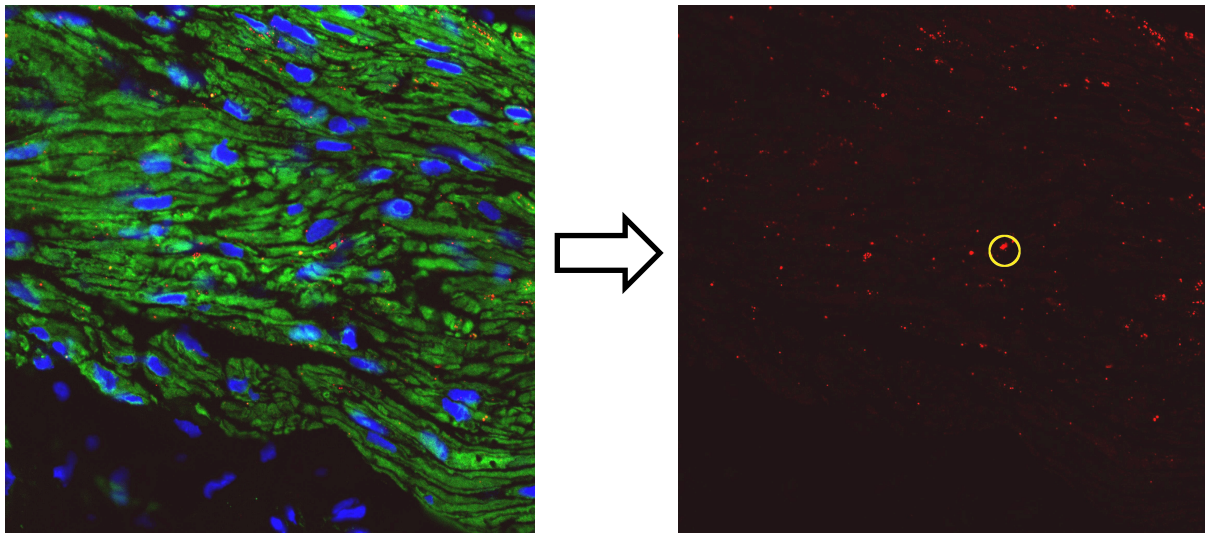


Abb. 9: Auswertung der LHCGR-Cluster im Detrusor. Links-unbearbeitetes Bild, rechts-Darstellung der Rezeptorfluoreszenz im roten Kanal, alle Pixel unter $1\mu\text{m}^2$ Größe werden addiert. Gelber Kreis: Ausschluss dieses Clusters als Verunreinigung, da die Größe $1\mu\text{m}^2$ übersteigt.

2.2.3. PCR

2.2.3.1. reverse Transkription

Um die aufgetauten RNA-Proben von Kontaminationen mit DNA zu reinigen, wurde $1\mu\text{g}$ RNA mit $1\mu\text{l}$ DNase und $1\mu\text{l}$ 10x DNase Puffer mit *Aqua dest.* auf $10\mu\text{l}$ aufgefüllt und gut gevortext. Nach exakt 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von $2\mu\text{l}$ EDTA gestoppt, die Probe dann im Cycler für 10 Minuten auf 65°C erwärmt und zu $10\mu\text{l}$ der gewonnenen RNA Suspension der hergestellte Master Mix (**Tabelle 5**) zugeben. Die reverse Transkription erfolgte mit folgenden Schritten: 25°C für 10 Minuten, 50°C für 15 Minuten und 85°C für 5 Minuten. Die so synthetisierte cDNA wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.3.2. Standard-PCR

Zur qualitativen Bestimmung des LHCGR wurde $1\mu\text{l}$ cDNA, $2\mu\text{l}$ Primer und $10\mu\text{l}$ 2x Master Mix von Promega (**Tabelle 2**) mit *Aqua dest.* auf $20\mu\text{l}$ aufgefüllt. Folgendes PCR-Programm wurde zur Amplifizierung verwendet: Initiale Denaturierung bei 95°C für 2 Minuten, 45 Zyklen bestehend aus 95°C , 30 Sekunden zur Denaturierung, 30 Sekunden zur Anlagerung der Primer mit spezifischer Temperatur (**Tabelle 8**) und 72°C , 1 Minute zur Kettenverlängerung. Der Nachweis der Produkte erfolgte auf 1,5%igem Agarosegel (**Tabelle**

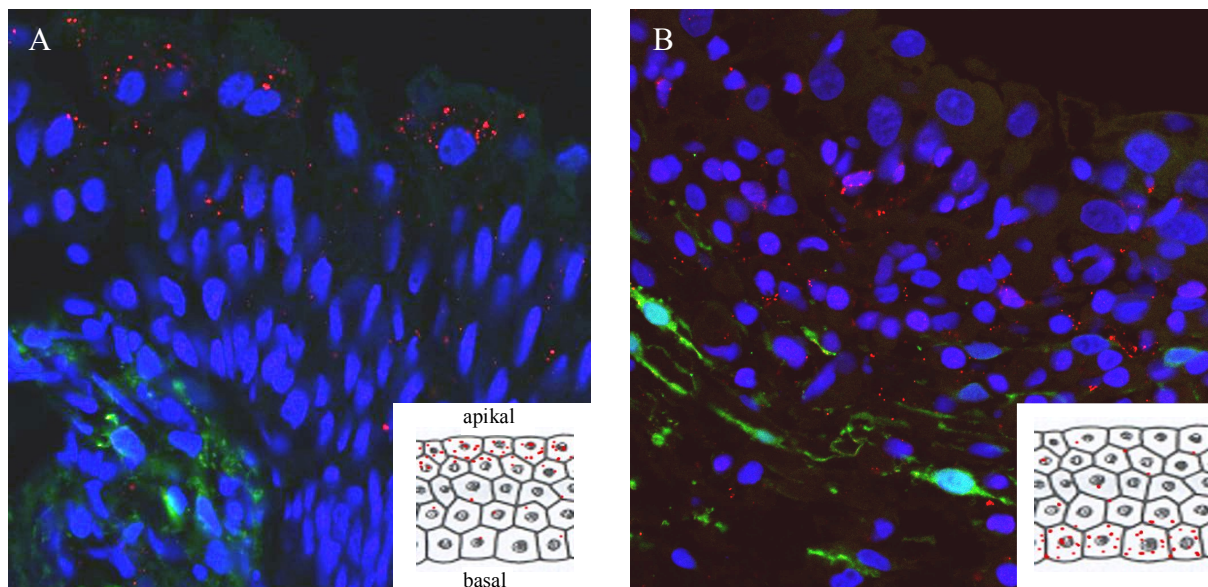
5) in TAE Puffer durch Gelelektrophorese (100 Volt, 2 Stunden) und Betrachtung unter UV-Licht (Transilluminator mit integrierter Kamera zur Fotodokumentation mit argus X.1 (**Tabelle 4**)). Aufgetragen wurde 8 μ l Standard und je 10 μ l Probe mit 2 μ l Blue juice, um den Fortschritt der Elektrophorese zu beurteilen. Als Amplifikationskontrolle diente das Housekeepinggen β -Aktin. Zum spezifischen Gewebenachweis wurde Cytokeratin 7 für das Urothel und α -Aktin für glatte Muskelzellen verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Immunhistochemie

3.1.1. Urothel

Das Urothel zeigt 5 unterschiedliche Verteilungsmuster des Rezeptors hinsichtlich seiner Lokalisation in bestimmten Zellschichten (**Abb. 10**). Im Verteilungsmuster 1 ist der Rezeptor vorwiegend auf die Umbrellazellschicht mit Lokalisation im Zytoplasma beschränkt. Verteilungsmuster 2 hingegen zeigt den LHCGR hauptsächlich in den Zellmembranen der basalen Zellschichten. Da Verteilungsmuster 3 eine Kombination von erstem und zweitem Verteilungsmuster darstellt, sieht man in der apikalen Zellschicht die größtenteils zytoplasmatische Lokalisation und in den Basalzellen auch den zellmembranständigen Rezeptor. Das nächste Verteilungsmuster ist durch eine diffuse Verteilung des LHCGR über alle Zellschichten charakterisiert und kann weder eindeutig als intrazellulär noch als membrangebunden identifiziert werden. Bei Verteilungsmuster 5 ist der Rezeptor in allen Zellschichten nur feinverteilt nukleär zu finden.



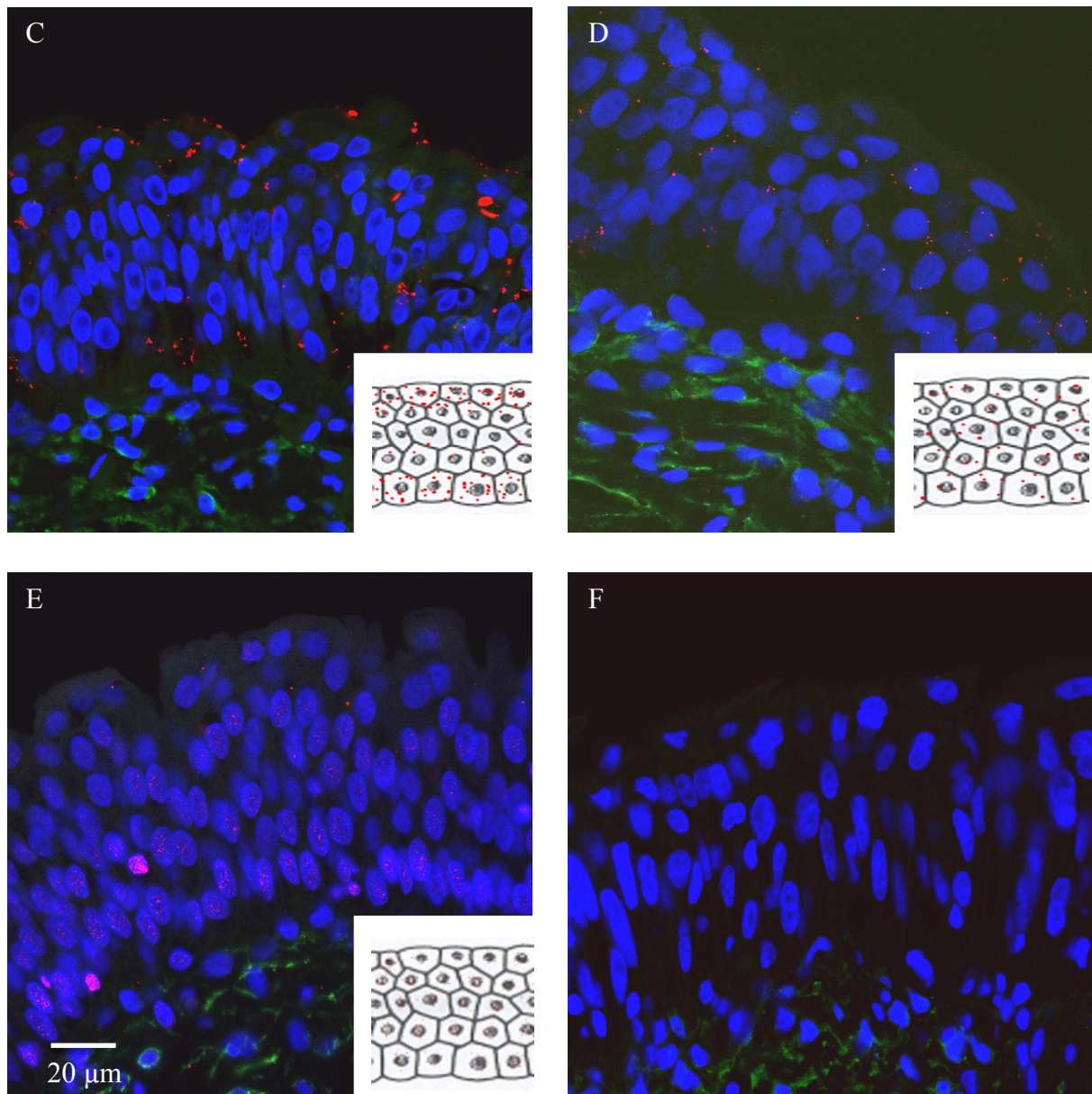


Abb. 10: Verteilungsmuster des LHCGR im Urothel. Verteilungsmuster 1 zeigt die vorwiegend apikale Verteilung des Rezeptors (A), während sich der LHCGR in Muster 2 eher in den basalen Zellschichten darstellt (B). Das dritte Muster ist eine Kombination aus 1 und 2 mit apikaler und basaler Lokalisation des Rezeptors (C). In Muster 4 ist er diffus über alle Zellschichten verteilt (D) und in Muster 5 ist der LHCGR auf die Zellkerne konzentriert (E). (F) Kontrollfärbung ohne LHCGR-Primärantikörper. Blau (To-Pro 3): Zellkerne, grün (Alexa 488): α -Aktin glatter Muskelzellen, rot (Alexa 555): LHCGR.

Vergrößerung der apikalen Zellschichten zeigen in Umbrellazellen die grobe Granulierung des Zytoplasmas bei Verteilungsmuster 1 und 3. Während bei Muster 4 keine Präferenz der Rezeptorexpression vorliegt, weist die vergrößerte Darstellung des Verteilungsmusters 5 eine feine Granulierung vor allem der Zellkerne auf (Abb. 11).

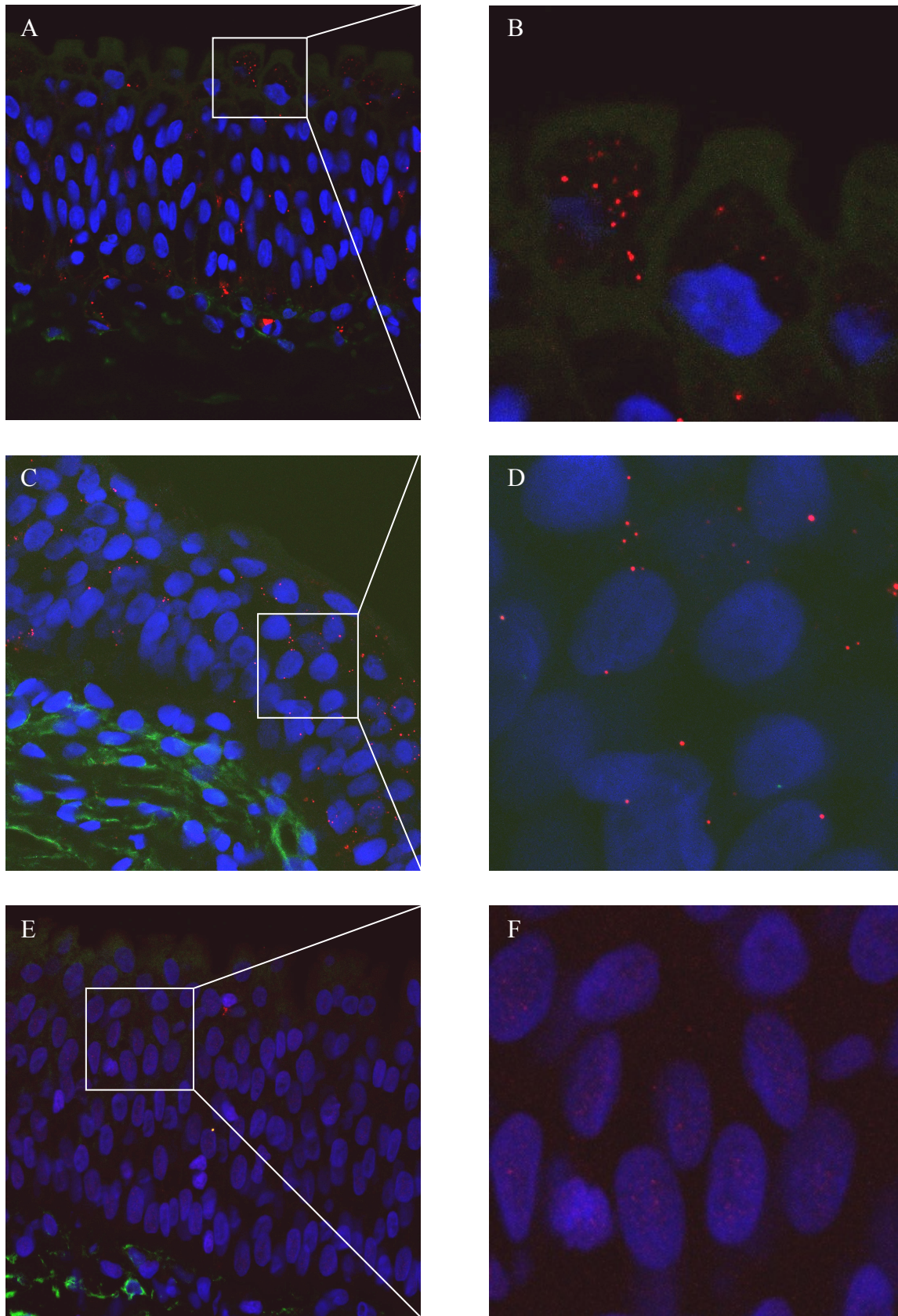


Abb. 11: Vergrößerte Darstellung der Urothelzellen. (A), (C) und (E) zeigen Verteilungsmuster 3, 4 und 5. In (B) sieht man die grobe Granulierung des Zytoplasmas der Umbrellazellen bei Verteilungsmuster 1 und 3 (Muster 1 nicht dargestellt), in (D) die diffuse Expression des Rezeptors bei Muster 4, während in (F) die feingranuläre Verteilung des Rezeptors auf die Kernregionen bei Verteilungsmuster 5 dargestellt ist.

In Kontroll-Blasen von weiblichen Patienten (n=11) findet sich eine Gleichverteilung der Muster 1, 3 und 5; Muster 2 und 4 treten nicht auf. Bei den männlichen Kontrollen (n=8) dominiert hingegen Muster 3 (n=5) mit 63%. Auch hier kommen Muster 2 und 4 nicht vor [(**Diagramme 1 und 2**), (**Abb. 12**)].

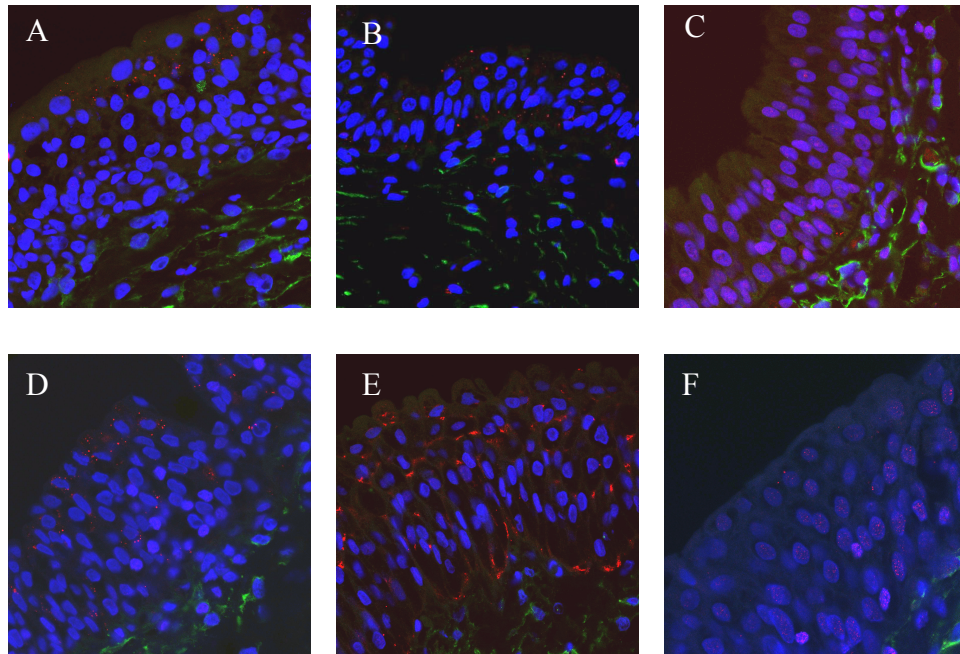


Abb. 12: Urothelaufnahmen aus Kontrollblasen. Obere Reihe: weibliche Kontrollblasen, untere Reihe: männliche Kontrollblasen, (A) und (D): Verteilungsmuster 1, (B) und (E): Verteilungsmuster 3, (C) und (F): Verteilungsmuster 5.

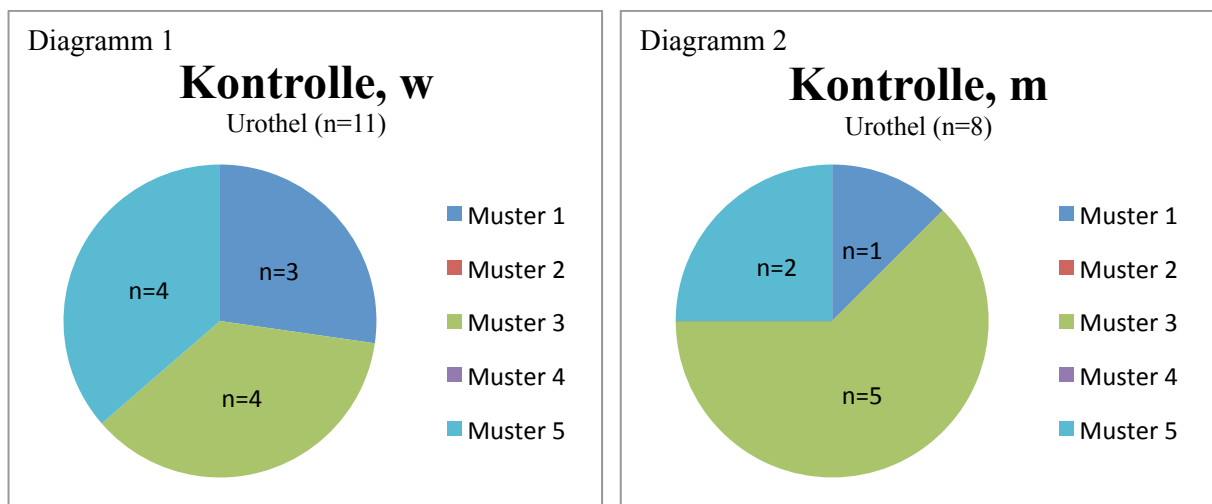


Diagramm 1 und 2: Anteil verschiedener Verteilungsmuster des LHCGR im Urothel von Kontrollharnblasen. Diagramm 1 zeigt die Verteilung bei weiblichen Präparaten, Diagramm 2 zeigt die Verteilung bei männlichen Präparaten.

Die Häufigkeitsverteilung in den weiblichen BPS/IC-Blasen hängt vom Zustand des Urothels ab: bei noch intaktem weiblichen Urothel (n=7) sieht man in mehr als der Hälfte der Fälle (57%) Muster 1. Hier kommt auch Muster 4 vor, nicht jedoch Muster 2 und 3. Bei geschädigtem weiblichen Urothel (n=8) ist Muster 5 in 75% der Harnblasen vorhanden, die übrigen Urothelien zeigen Muster 4. Von 4 männlichen BPS/IC-Präparaten weisen nur 2 Harnblasen Urothel auf. Diese zeigen bei intaktem Urothel Verteilungsmuster 3 und bei geschädigtem Urothel Muster 4 [(Diagramme 3 und 4), (Abb. 13)].

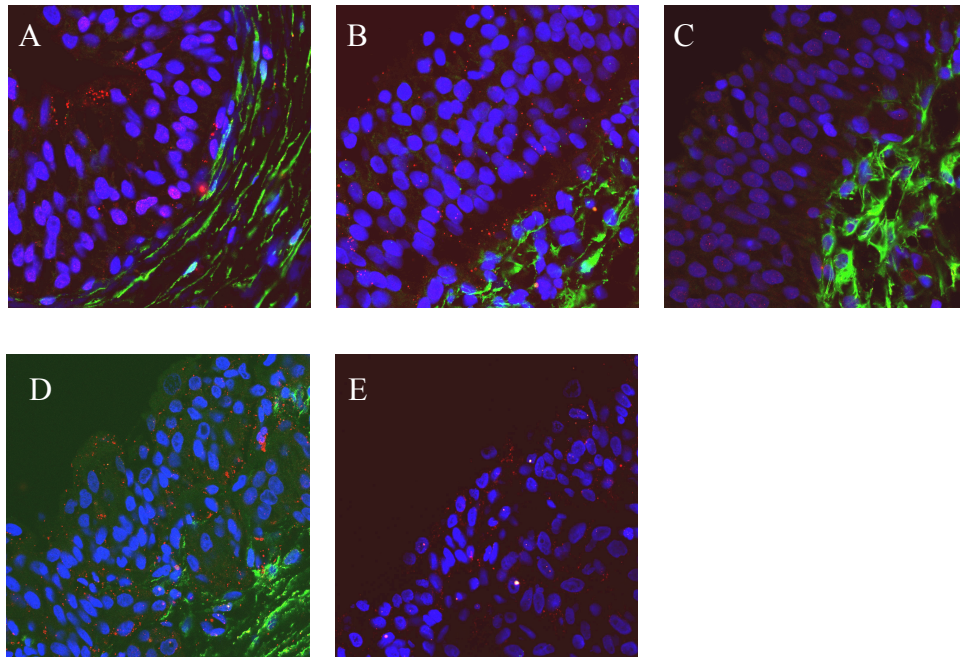


Abb. 13: Urothelaufnahmen aus Harnblasen mit BPS/IC. Obere Reihe: weibliche Harnblasen mit BPS/IC, untere Reihe: männliche Harnblasen mit BPS/IC. (A) und (D) intaktes Urothel, (B), (C) und (E) geschädigtes Urothel. (A) Verteilungsmuster 1, (B) und (E) Verteilungsmuster 4, (C) Verteilungsmuster 5, (D) Verteilungsmuster 3.

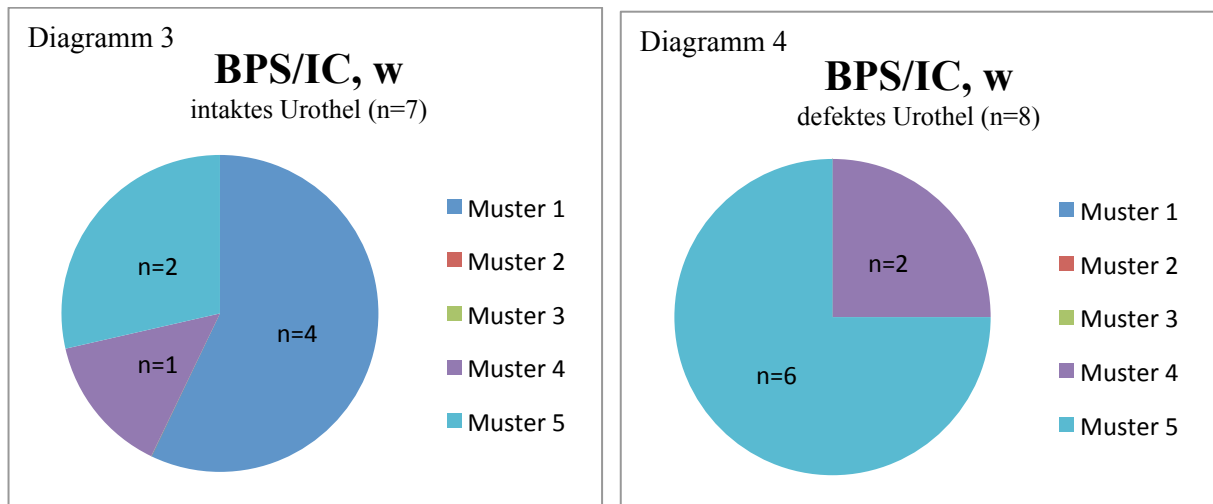
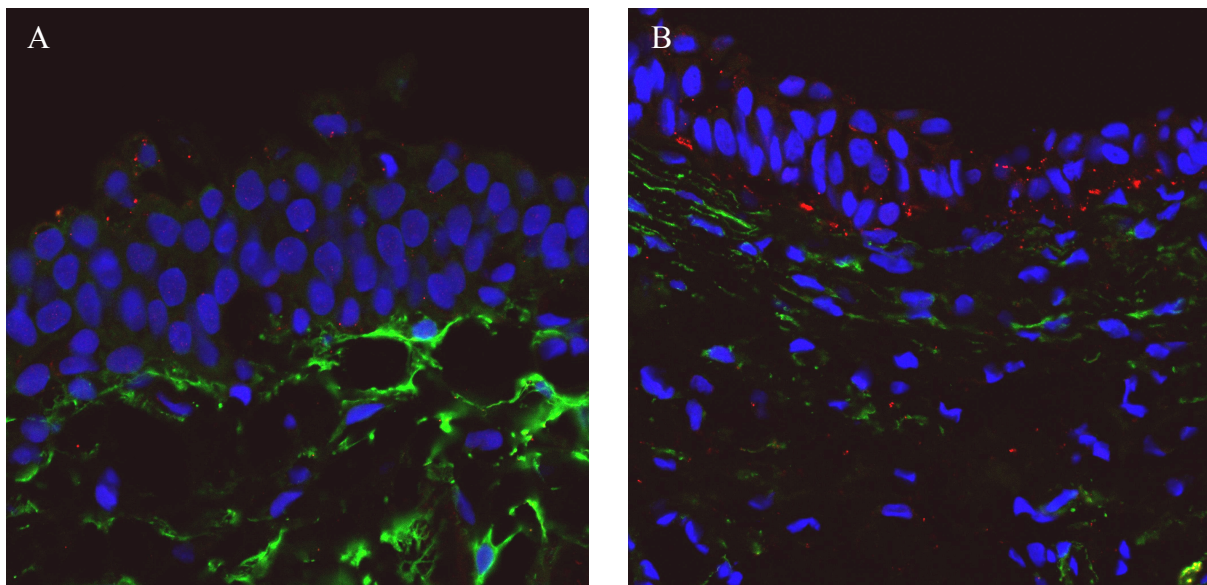


Diagramm 3 und 4: Anteil verschiedener Verteilungsmuster des LHCGR im Urothel von weiblichen Harnblasen mit BPS/IC. Diagramm 3 zeigt die Verteilung bei intaktem Urothel, Diagramm 4 zeigt die Verteilung bei defektem Urothel.

Als defektes Urothel wurde festgelegt:

- fehlende Umbrellazellschicht
- sehr starke Abflachung des Urothels auf 2-3 Zellreihen, sodass das Urothel unregelmäßig begrenzt erscheint
- ungeordnete Anordnung der Zellschichten (**Abb. 14**)



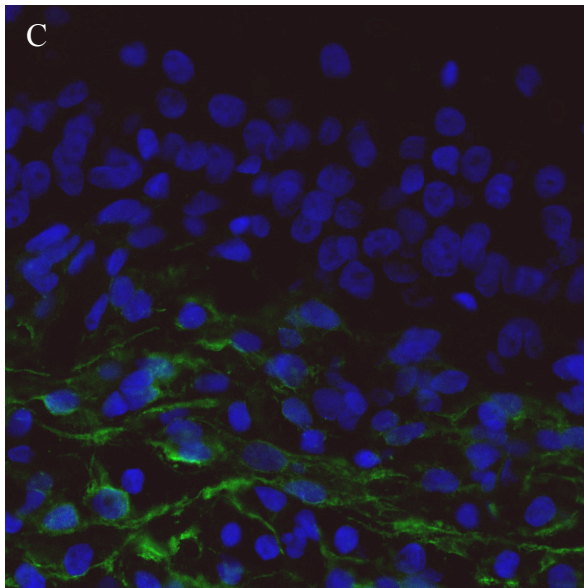


Abb. 14: Beispiele für defektes Urothel. (A) fehlende Umbrellazellschicht, (B) mehrere Zellschichten fehlen, (C) ungeordnete Zellschichten

Eine andere Möglichkeit ist die Orientierung an der Einteilung der Urothelmorphologie nach Slobodov et al. (54). Das Urothel mit der stärksten Schädigung (Morphologie 0) ist auf 1-2 Zellschichten abgeflacht und weist keine Umbrellazellen mehr auf. In der Urothel-Morphologie 1 sind zwischen 3 und 5 Zellschichten vorhanden, jedoch zeigen die Zellen nicht ihre charakteristische Größendifferenzierung und ebenfalls noch keine Umbrellazellen. Morphologie 2 ist charakterisiert durch zunehmende Polarisierung der Zellschichten mit Größenzunahme nach apikal und vereinzelt Umbrellazellen bzw. ein dünnes Urothel von bis zu 3 Zellschichten. Gesundes Urothel (Morphologie 3) stellt sich mit den Merkmalen der polarisierten Zellen, einer durchgängigen Umbrellazellschicht und einer Gesamtdicke von mindestens 5 Zellschichten dar (**Abb. 15**). Jede dieser Morphologien kann in den verschiedenen hier untersuchten Präparaten gefunden werden, allerdings wird wegen der geringen Präparatezahl in den Morphologien 0-3 dieses Scoringssystem in der Auswertung der BPS/IC-Urothelien nicht berücksichtigt.

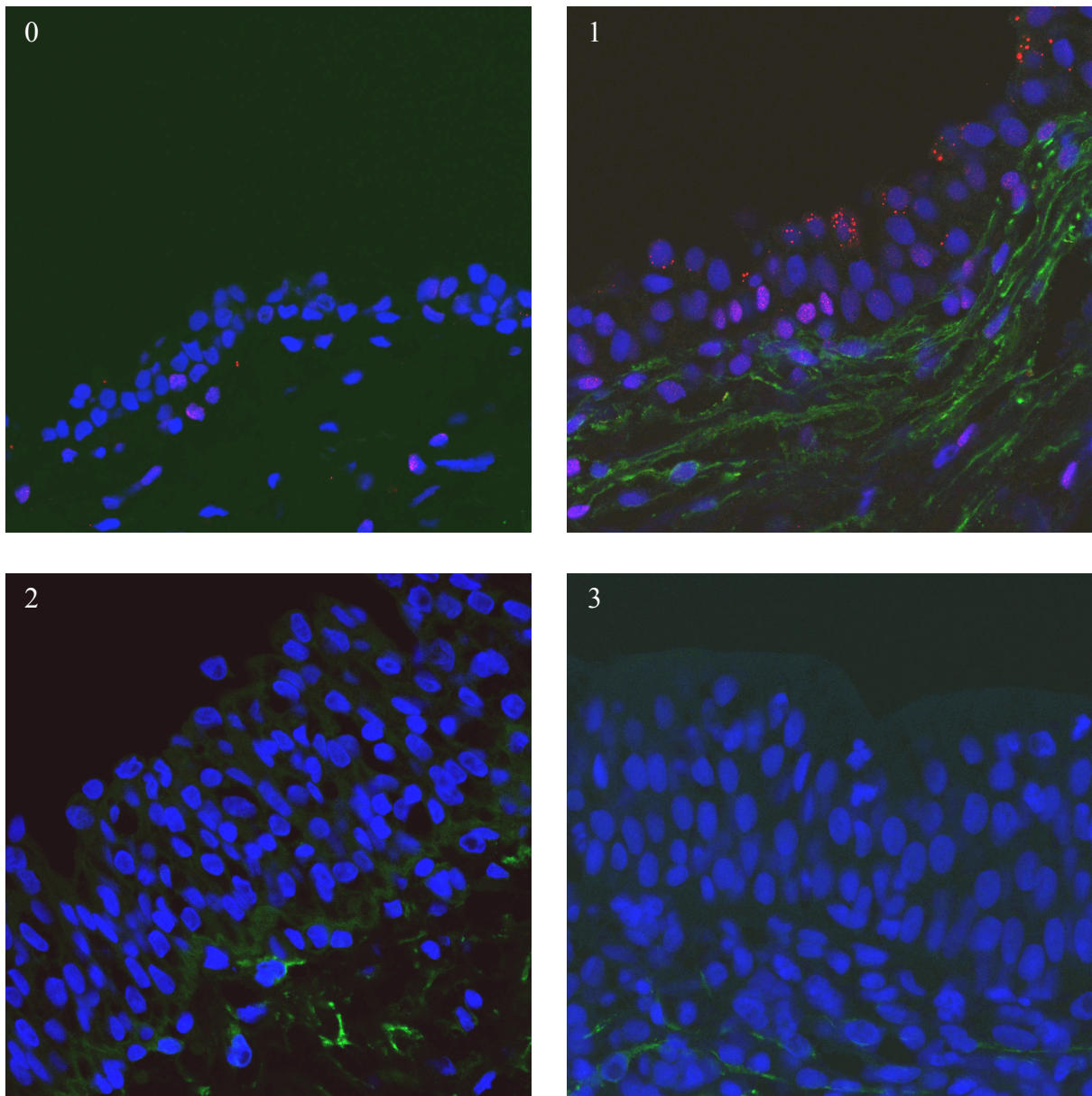


Abb. 15: Urothelmorphologie. (0)- Urothel 1-2 Schichten dick, alle Zellen gleich groß, keine Umbrellazellen, (1)- Urothel 3-5 Schichten dick, alle Zellen gleich groß, keine Umbrellazellen, (2)- geringe Polarisation bzgl. Zellgröße, vereinzelt Umbrellazellen oder Urothel dünn (bis 3 Schichten), (3)- Urothel polarisiert bzgl. Zellgröße, Umbrellazellen fast durchgängig, mind. 5 Schichten.

Im Urothel von Ureteren (n=7) kann der LHCGR ebenfalls detektiert werden. Sowohl in männlichen (n=4) als auch in weiblichen (n=3) Präparaten zeigen sich die Verteilungsmuster 1 und 3 aus dem Urothel der Harnblase. Dabei weisen 2 von 3 weiblichen Urothelien Muster 3 und das Urothel des dritten Ureters Muster 1 auf. Bei Männern hingegen dominiert Verteilungsmuster 1 (3 von 4 Präparaten) über Muster 3 (1 von 4 Präparaten) (**Abb. 16**).

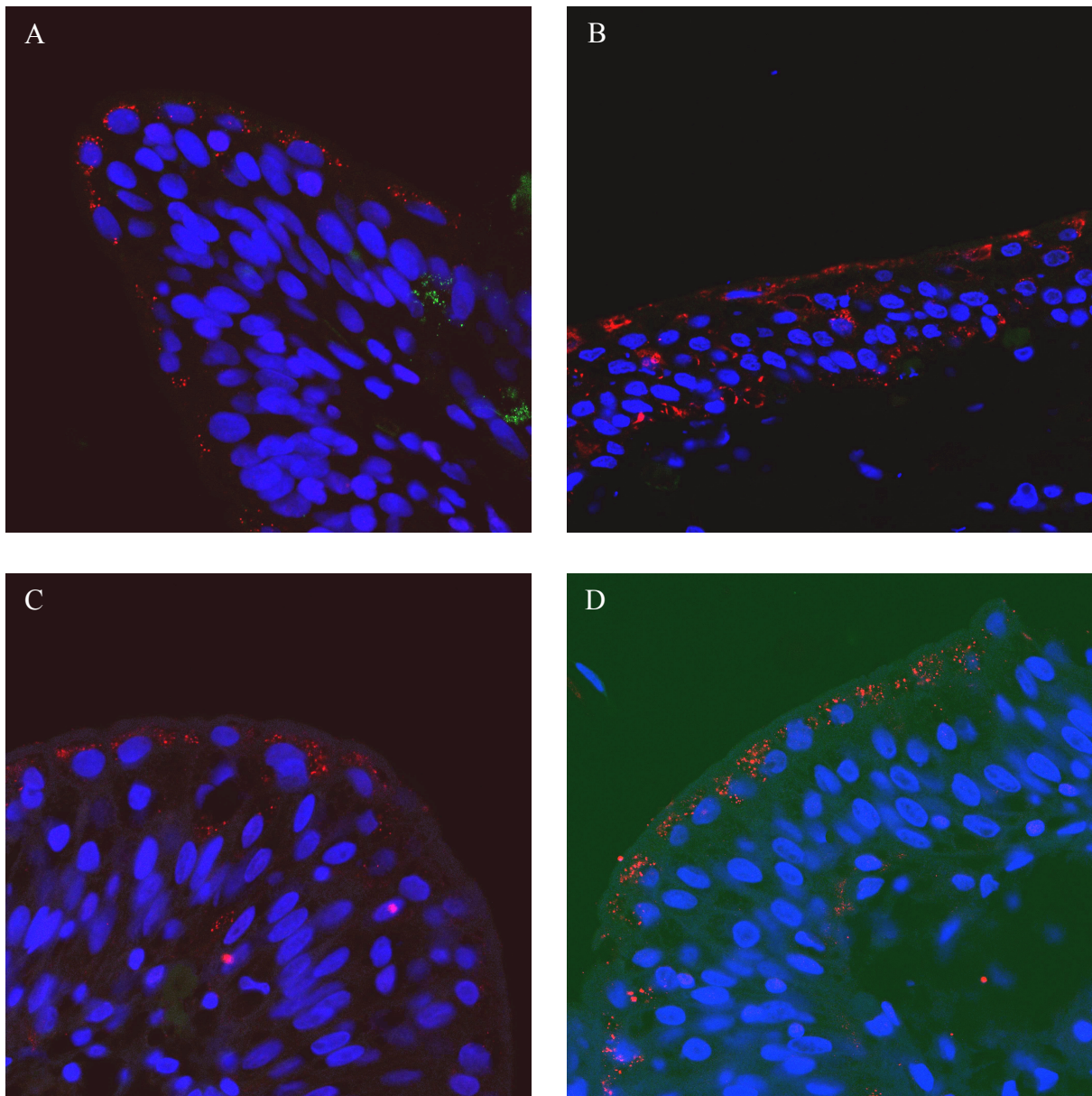


Abb. 16: Urothelaufnahmen aus Ureteren. Obere Reihe: weibliche Präparate, untere Reihe: männliche Präparate. (A) und (C) zeigen Verteilungstyp 1, (B) und (D) zeigen Verteilungstyp 3.

Verteilungsmuster 1 und 3 zeigen in weiblichen Kontrollblasen keine feingranuläre Färbung der Kernregionen (**Abb. 17**). In weiblichen BPS/IC-Blasen mit intaktem Urothel hingegen kann man bei Vergrößerung der Zellschichten die Feingranulierung bei Muster 1 (4/4), aber nicht bei Muster 4 (1/1) finden (**Abb. 18**).

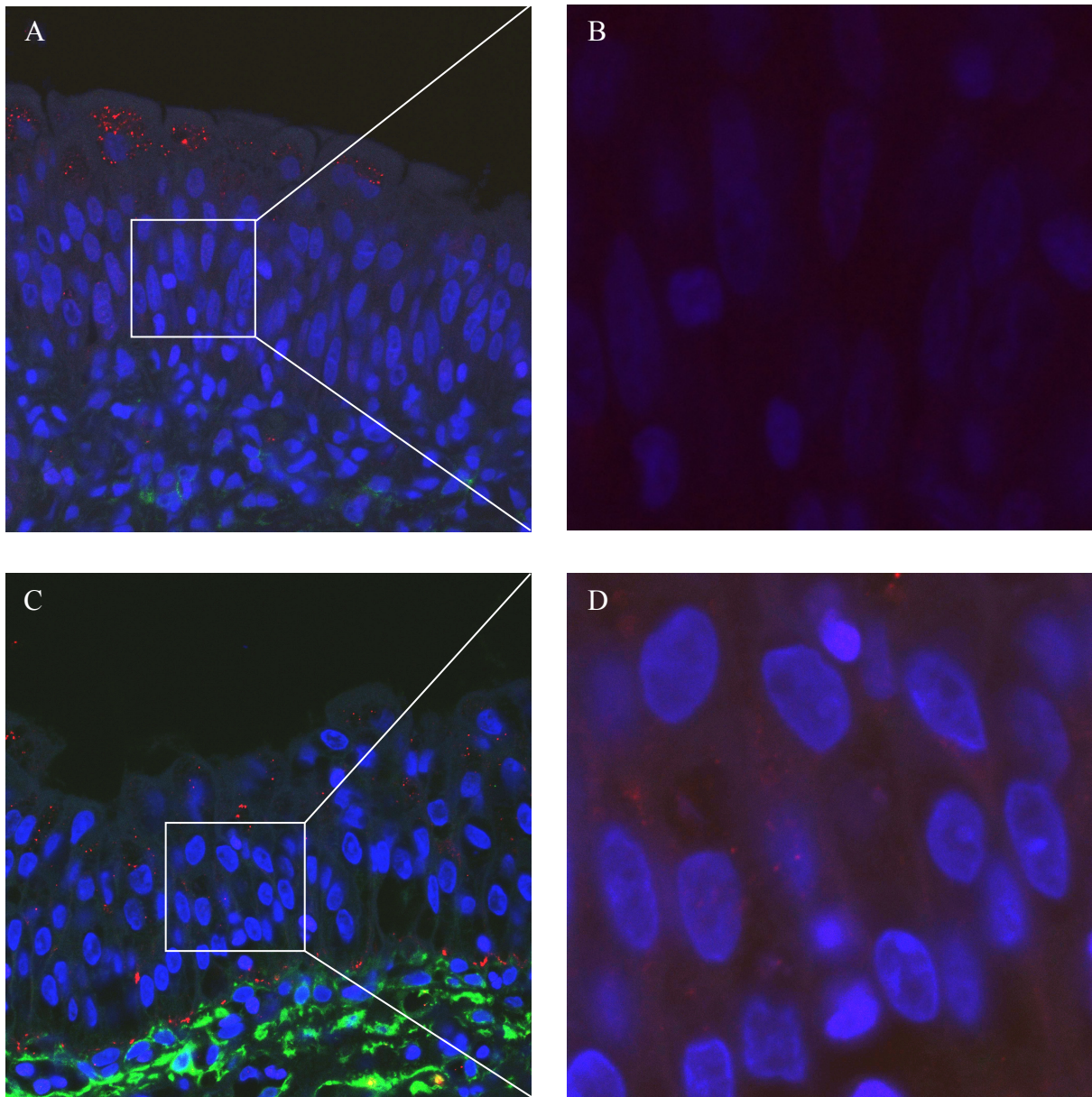


Abb. 17: Feingranulierung der Verteilungsmuster in Kontrollblasen. (A) und (B) zeigen keine feingranuläre Färbung der Zellkerne bei Verteilungsmuster 1, (C) und (D) zeigen ebenfalls keine Feingranulierung bei Verteilungsmuster 3 in weiblichen Kontrollblasen.

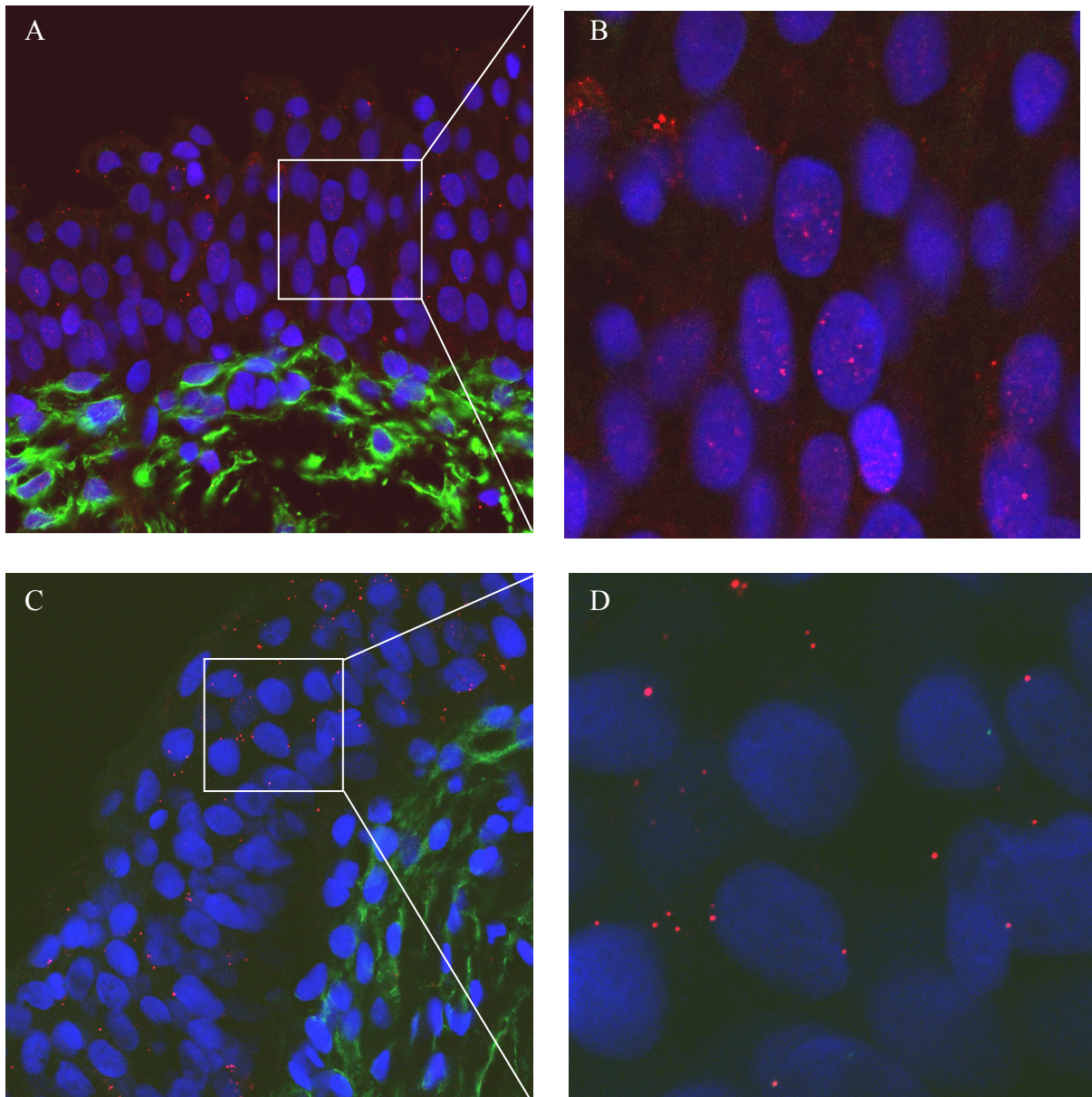


Abb. 18: Feingranulierung der Verteilungsmuster in BPS/IC-Blasen. Feingranuläre Verteilung des LHCGR bei Muster 1 ((A) und (B)) in BPS/IC-Blasen mit intaktem Urothel. (C) und (D) zeigen Verteilungsmuster 4, in dem die Kerne nicht feingranuliert sind.

3.1.2. Detrusor

Detrusoraufnahmen können optisch in 3 unterschiedliche Verteilungsmuster eingeteilt werden. Muster 1 ist charakterisiert durch eine starke Färbung des Zytoplasmas mit vereinzelten großen Clustern. In Muster 2 ist ein sehr schwach gefärbtes Zytoplasma mit mehreren großen Clustern zu sehen. Das dritte Muster stellt sich mit einer mittelstarken Zytoplasmafärbung und vielen großen Clustern dar (**Abb. 19**).

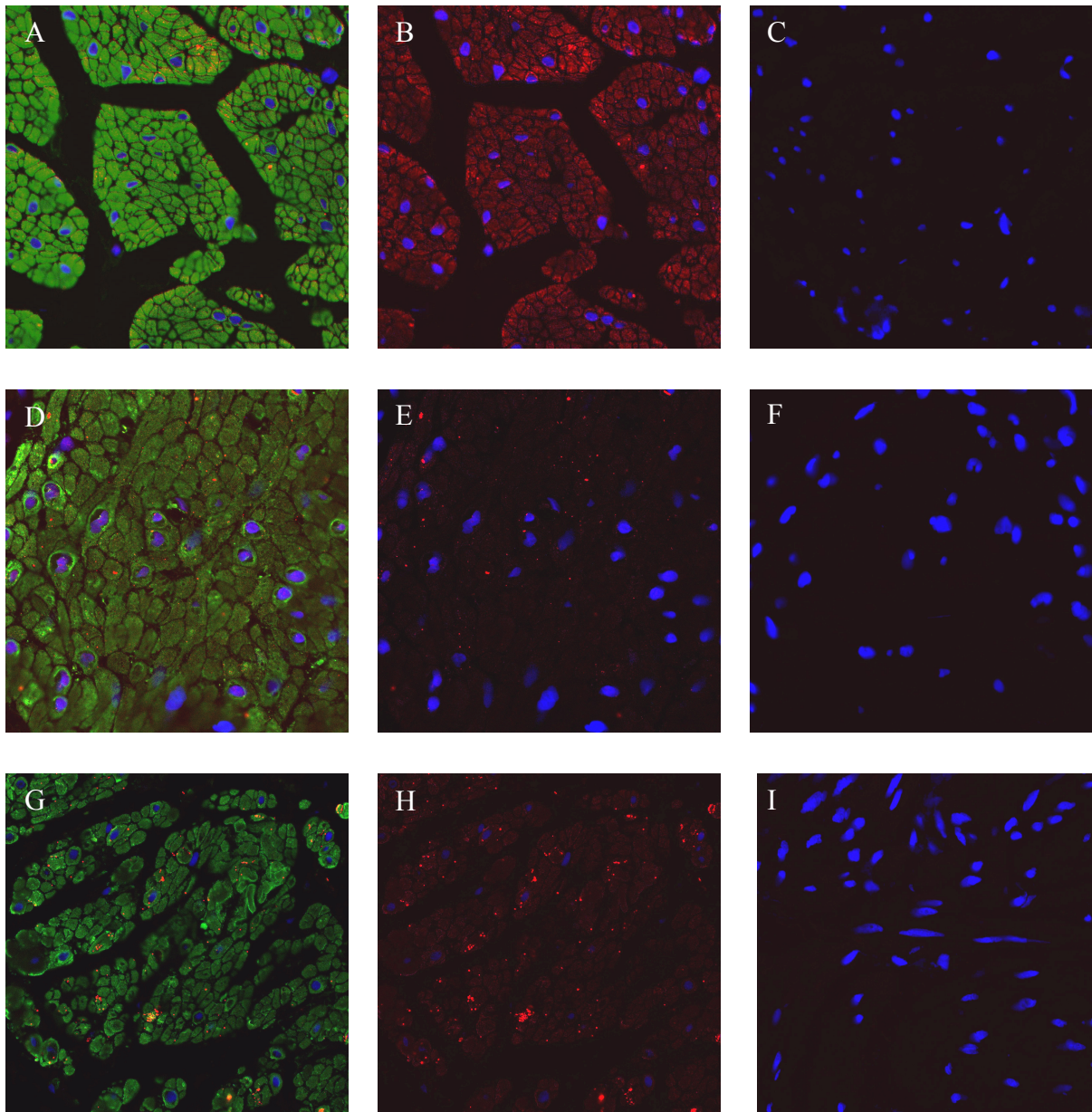


Abb. 19: Verteilungsmuster im Detrusor. (A) und (B) zeigen Verteilungsmuster 1 mit starker Zytoplasmafärbung und vereinzelten Clustern, (D) und (E) zeigen Verteilungsmuster 2, das durch eine sehr geringe Färbung des Zytoplasmas mit mehreren Clustern typisiert ist, Verteilungsmuster 3 ist in (G) und (H) abgebildet und stellt sich mit einer mittelstarken Färbung des Zytoplasmas und vielen Clustern dar. (B), (E) und (H) Aufnahmen ohne grünen Kanal (glatte Muskulatur), nur Kern- und Rezeptorfärbung sichtbar. (C), (F) und (I) Kontrollfärbung ohne LHCGR-Primärantikörper und ausgeschaltetem grünen Kanal (glatte Muskulatur).

Im Detrusor weiblicher Kontrollblasen (n=10) zeigen 50% der Präparate Verteilungsmuster 3, in männlichen Kontrollblasen (n=8) sind es nur 13%, der Rest entfällt hier auf Muster 2 (7 von 8 Präparaten). Eine ähnliche Verteilungshäufigkeit findet sich in den weiblichen Harnblasen mit BPS/IC, in denen Muster 2 bei 77% der Präparate vorliegt. Erkrankte männliche Harnblasen zeigen auch eine Expression des Rezeptors, sind jedoch nicht repräsentativ, da nur 3 Präparate zur Auswertung vorliegen (**Diagramme 5 bis 8**).

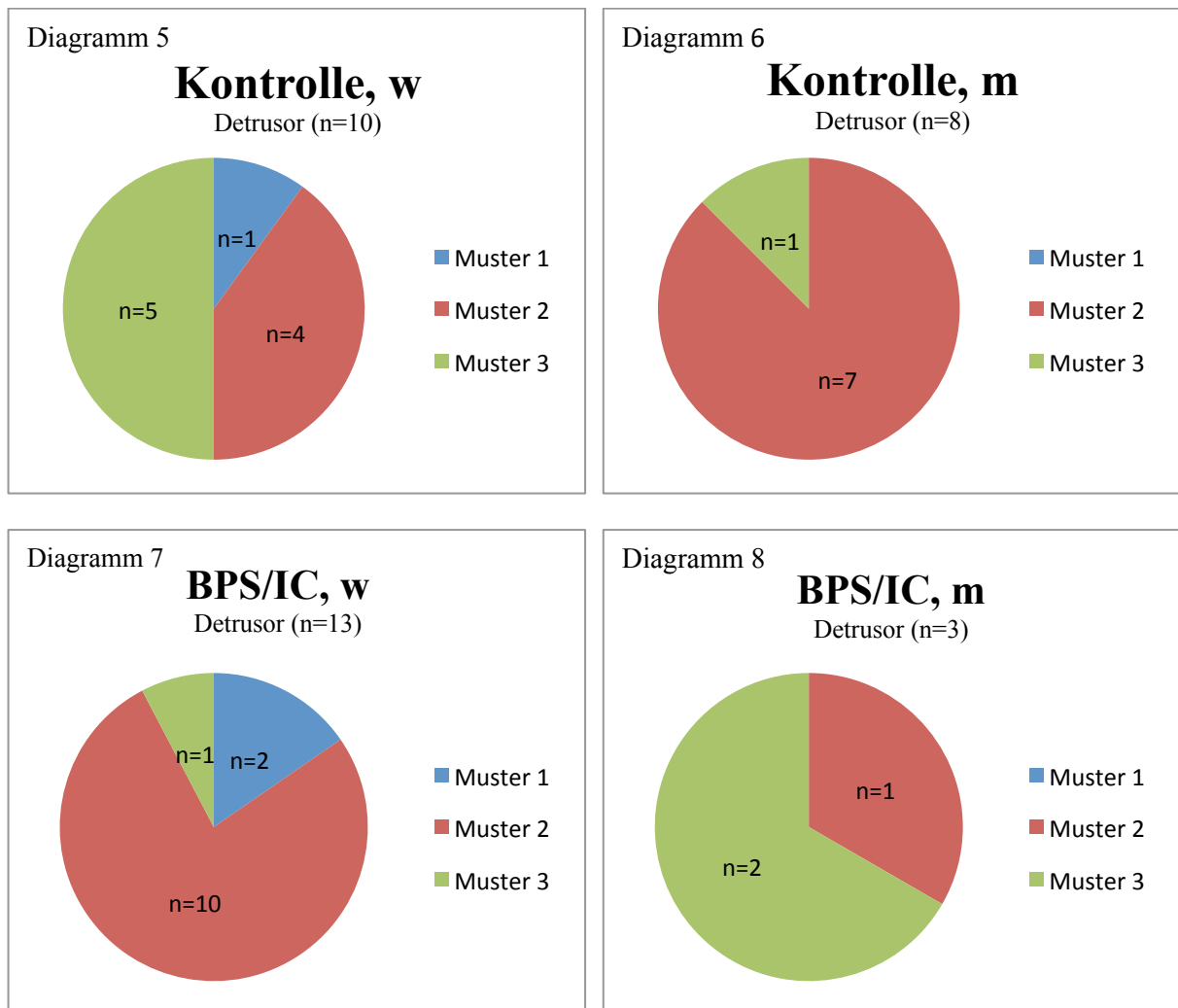


Diagramm 5 bis 8: Anteil verschiedener Verteilungsmuster des LHCGR im Detrusor. **Diagramm 5** zeigt die Verteilung des LHCGR in weiblichen Kontrollharnblasen, **Diagramm 6** zeigt die Verteilung in männlichen Kontrollharnblasen, **Diagramm 7** zeigt die Verteilung in weiblichen BPS/IC-Harnblasen, **Diagramm 8** zeigt die Verteilung in männlichen BPS/IC-Harnblasen.

Die Muskelschichten der Ureteren zeigen in beiden Geschlechtern die Expression des LHCGR. Dabei finden sich in 3 von 4 Männern Muster 3, der vierte Mann weist Muster 1 auf. Nur 2 der 3

weiblichen Ureteren zeigen Anschnitte von Muskulatur. Ein Präparat stellt Muster 2 dar, das andere Muster 3 (**Abb. 20**).

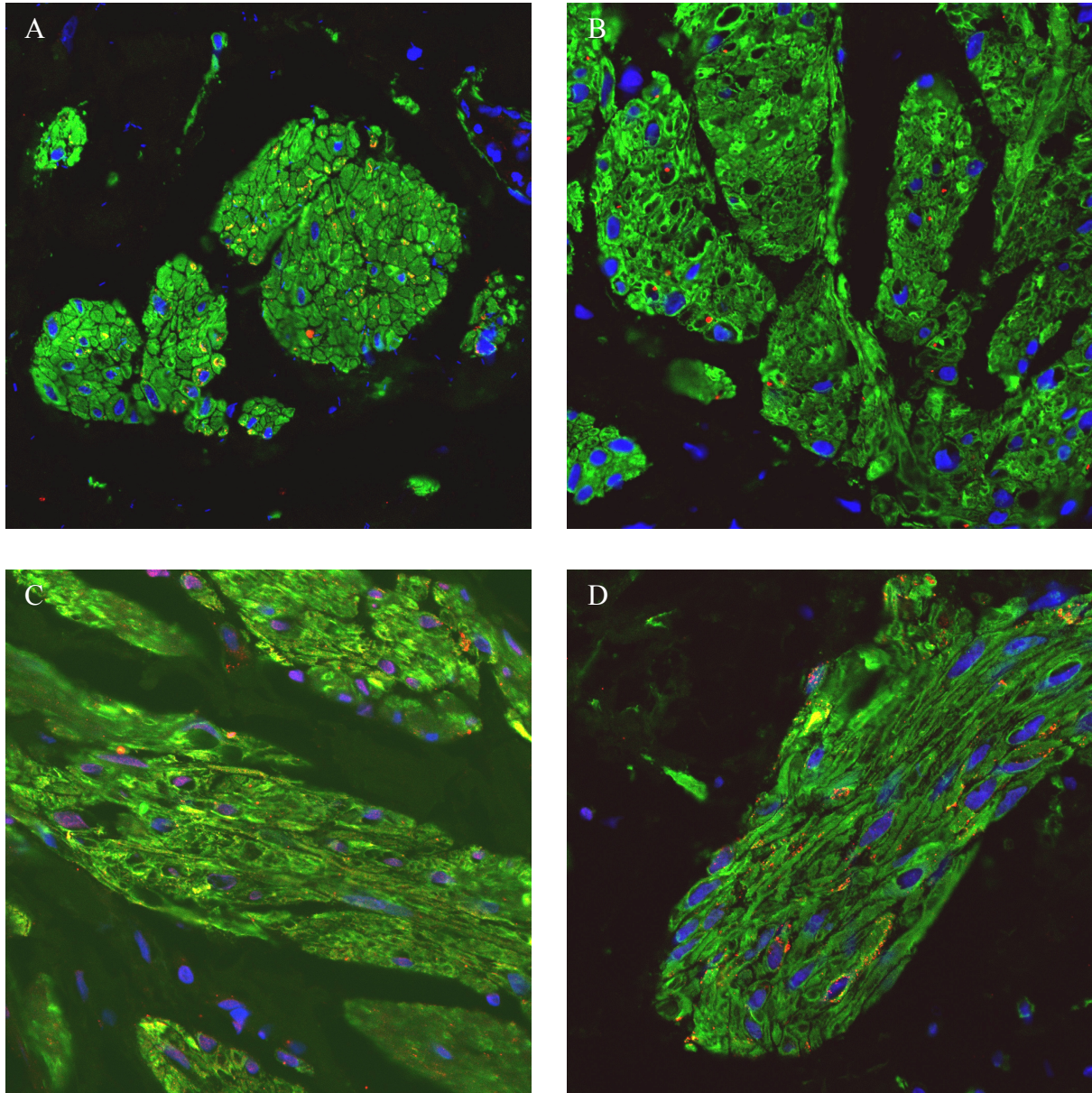


Abb. 20: Darstellung des LHCGR in der ureteralen Muskulatur. (A) und (B): weibliche Präparate, (C) und (D): männliche Präparate.

Zur Objektivierung der rein optisch eingeteilten Muster wurde eine quantitative Auswertung der einzelnen Cluster (Rezeptorkomplexe) vorgenommen. Der Anteil der summierten Komplexe einer Aufnahme wird als Fläche in μm^2 angegeben und über 5 Bilder eines Präparates gemittelt. Dabei zeigt sich keine Korrelation der Clustergröße in den untersuchten Muskelzellen von Kontrollharnblasen (m und w) und BPS/IC-Harnblasen (m und w) (**Diagramm 9**).

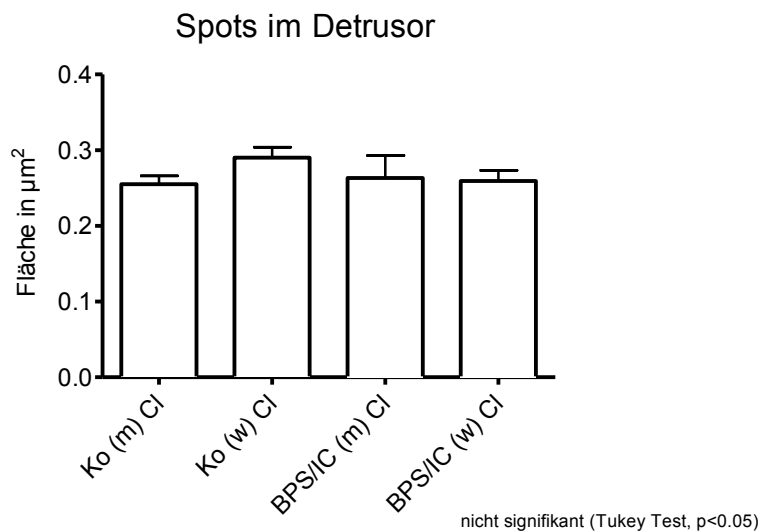


Diagramm 9: Quantitative Korrelation der Rezeptorcluster. Zwischen den untersuchten Entitäten Kontrollharnblase und BPS/IC-Harnblase konnte kein Unterschied in der Größe der Cluster (in μm^2) gefunden werden. Ebenso zeigt sich keine geschlechtsspezifische Korrelation der Cluster. Angaben in Mean + SEM.

3.1.3. weitere Lokalisationen des LHCGR

Sowohl in der Lamina muscularis mucosae (**Abb. 21**) als auch in den glatten Muskelzellen von Blutgefäßen der Harnblasenwand wird der LHCGR exprimiert (**Abb. 22**).

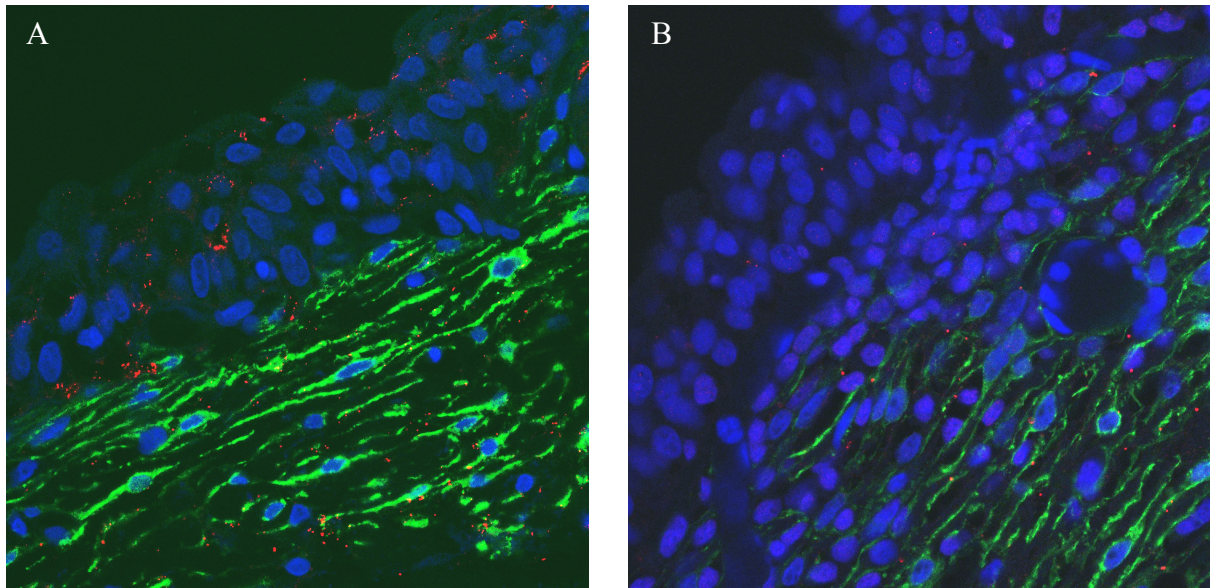


Abb. 21: LHCGR-Expression in Lamina muscularis mucosae der Harnblase. (A) männliche Harnblase, (B) weibliche Harnblase.

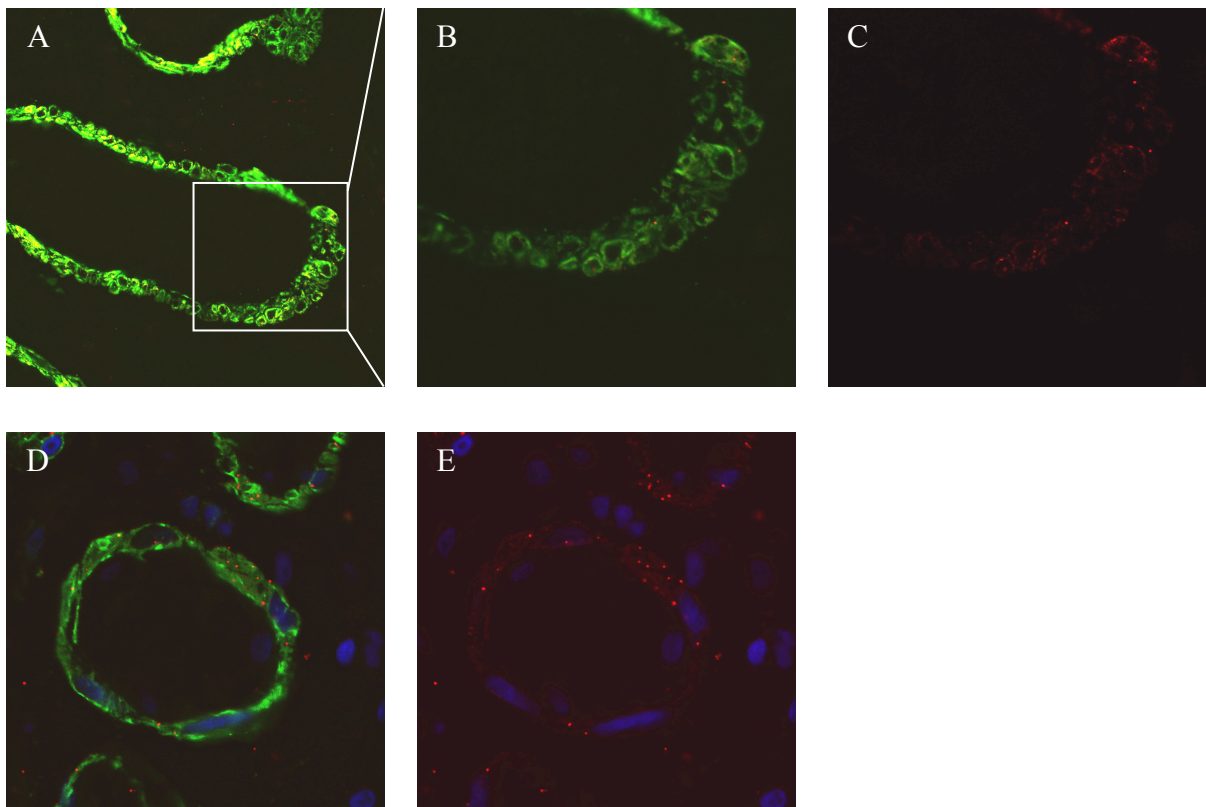


Abb. 22: LHCGR-Expression in Gefäßen der Harnblasenwand. (A) und (D) Gefäß, (B) vergrößerte Darstellung von (A), (C) und (E) Muskelzellkanal (grün) ausgeschaltet, nur Kerne (blau) und Rezeptor (rot) sichtbar.

3.1.4. statistische Auswertung konfokaler Bilder

Die folgenden Diagramme sind mit GraphPad Prism 5 erstellt.

Der Nachweis des LHCGR gelingt im Urothel und Detrusor von weiblichen Harnblasen in den Altersstufen zwischen 33-80 Jahren und in männlichen Harnblasen zwischen 37-76 Jahren.

Alle verwendeten Gewebe (Urothel und Detrusor von Harnblase und Ureter) wurden zunächst auf eine Altersabhängigkeit der Fluoreszenzaktivität untersucht. Dabei entspricht das Patientenalter dem Zeitpunkt der Diagnosestellung und Biopsieentnahme. Kein Gewebe zeigt eine signifikante Korrelation zwischen Alter des Patienten und dem Grad der LHCGR Expression (**Diagramme 10 und 11**).

Diagramm 10

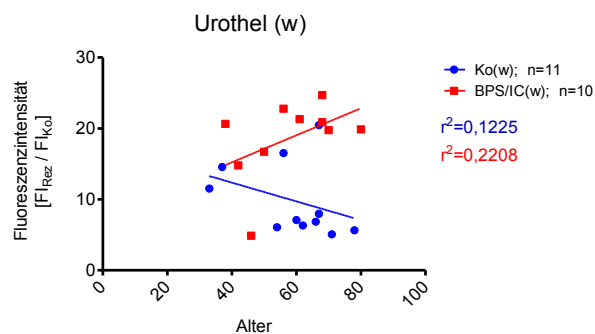


Diagramm 11

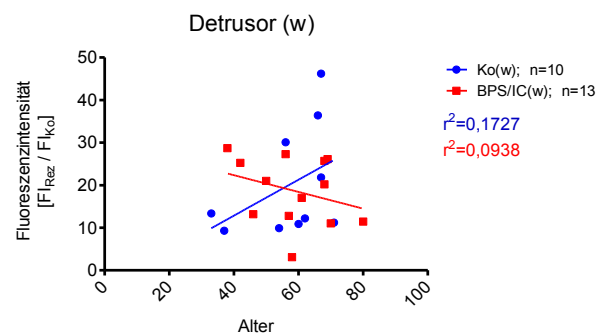


Diagramm 10 und 11: Alterskorrelation der Fluoreszenzintensitäten. Diagramm 10 zeigt keine Alterskorrelation der Fluoreszenzintensitäten im Urothel von weiblichen Kontroll – und BPS/IC-Harnblasen, Diagramm 11 zeigt auch keine Korrelation des Patientenalters mit den ermittelten Fluoreszenzintensitäten im Detrusor von weiblichen Kontroll – und BPS/IC-Harnblasen. Die entsprechenden männlichen Präparate zeigen ebenso keine Korrelation (nicht dargestellt).

Der Vergleich von gesunden und erkrankten männlichen Harnblasen (Urothel und Detrusor) ist aufgrund der geringen Anzahl der BPS/IC-Präparate (n=3) statistisch nicht aussagekräftig und deshalb nicht als Diagramm dargestellt.

Im weiblichen Urothel ist die Expression des LHCGR in BPS/IC-Blasen gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht, nicht jedoch im Detrusor (**Diagramme 12 und 13**).

Diagramm 12

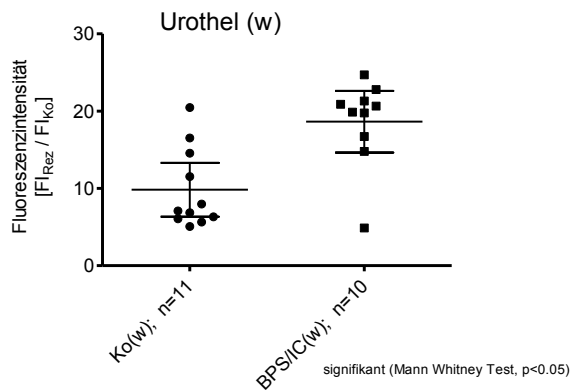


Diagramm 13

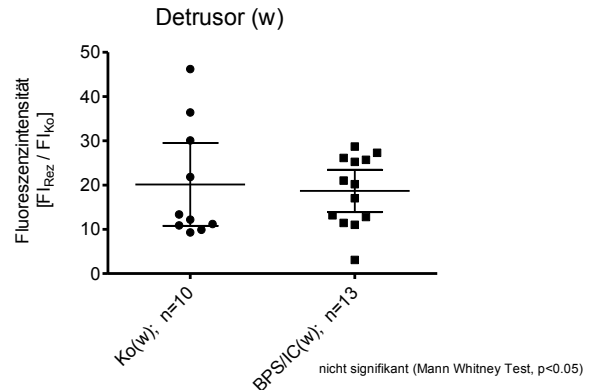


Diagramm 12 und 13: quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensitäten in weiblichen Präparaten. Diagramm 12 zeigt den signifikanten Unterschied in der urothelialen Fluoreszenzintensität zwischen weiblichen Kontroll – und BPS/IC-Harnblasen. Diagramm 13 hingegen stellt die einheitliche Fluoreszenzintensität im Detrusor weiblicher Kontroll – und BPS/IC-Harnblasen dar. Angaben in Mean with 95% CI.

Der geschlechtsspezifische Vergleich innerhalb der untersuchten Gruppen ist in den Diagrammen 14 bis 17 und in Tabelle 9 dargestellt. Nur im Urothel der BPS/IC-Blasen ist eine höhere Expression des LHCGR der weiblichen gegenüber den männlichen Patienten nachzuweisen, allerdings sind die männlichen BPS/IC-Blasen mit nur 2 Präparaten nicht repräsentativ. Alle anderen Diagramme zeigen keine unterschiedliche Expression des Rezeptors zwischen Männern und Frauen.

Diagramm 14

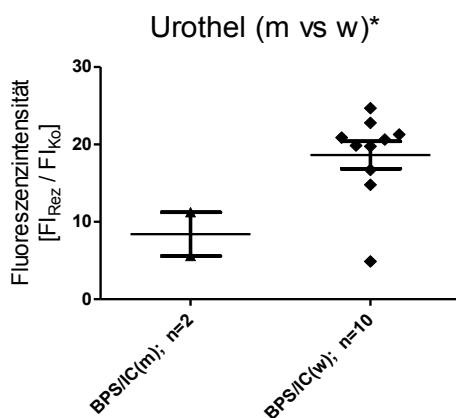


Diagramm 15

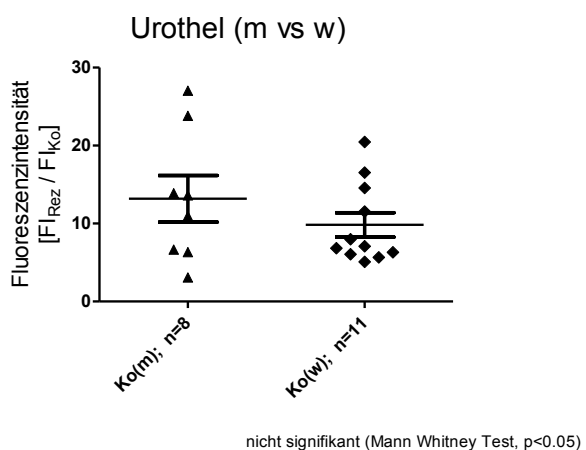


Diagramm 16



Diagramm 17

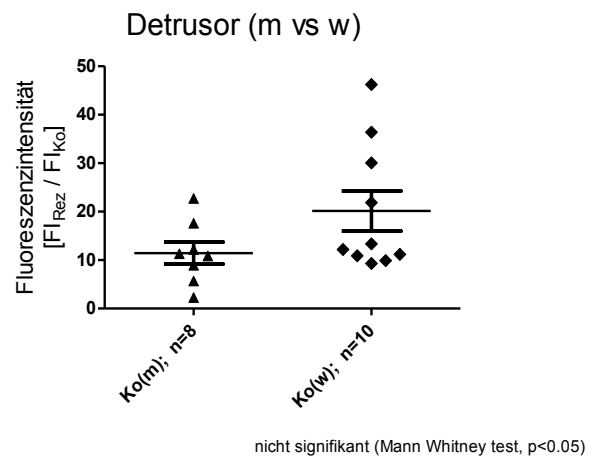


Diagramm 14 bis 17: Geschlechtsspezifischer Vergleich der Fluoreszenzintensitäten.

Statistische Auswertung des geschlechtsspezifischen Vergleichs der Fluoreszenzintensitäten von BPS/IC-Harnblasen im Urothel (**Diagramm 14**) und im Detrusor (**Diagramm 16**). Geschlechtsspezifischer Vergleich für Kontrollharnblasen im Urothel (**Diagramm 15**) und im Detrusor (**Diagramm 17**). *: statistische Auswertung aufgrund der geringen Präparatezahl nicht möglich. Angaben in Mean + SEM.

	Kontrolle	BPS/IC	weiblich	männlich
Urothel	w = m	w > m*	BPS/IC > Ko	BPS/IC = Ko*
Detrusor	w = m	w = m	BPS/IC = Ko	BPS/IC = Ko

Tabelle 9: Tabellarische Darstellung der Fluoreszenzintensitäten im Vergleich. Nur im Urothel konnte zwischen weiblichen Kontroll - und BPS/IC-Harnblasen ein signifikanter Unterschied in der Expressionshöhe des LHCGR ermittelt werden. *: statistische Auswertung aufgrund der geringen Präparatezahl nicht möglich.

3.2. PCR

3.2.1. Standard-PCR:

Die qualitative PCR kann im Urothel und Detrusor von 4 BPS/IC-Harnblasen (m: n=1, w: n=3) und 10 Kontrollharnblasen (m: n=5, w: n=5) die Expression des LHCGR nachweisen. Die Primer amplifizieren ein 158 bp langes Fragment, das sich in der TMD (Exon 11) des Rezeptors befindet. Der Nachweis des LHCGR in der Plazenta (14.SSW) dient als Beispiel eines Organs mit sicherer Rezeptorexpression. Zur Überprüfung der regelrechten Amplifikation ist die β -Aktin-Expression als interner Standard sowohl in der Plazenta (14.SSW) als auch in der Harnblase (nicht dargestellt) mitbestimmt (**Abb. 23**).

Zum gewebetypischen Nachweis ist in Harnblasenproben entweder Cytokeratin 7 als urothelspezifisch oder α -Aktin als muskelspezifisch mitamplifiziert.

Die Kontrolle der cDNA erfolgt mittels Sequenzierung der Amplifikate durch Frau Konstanze Büttner, MTA der Klinik und Polyklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie an der Universität Leipzig.

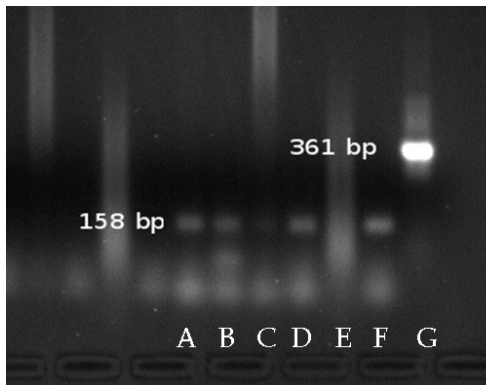


Abb. 23: PCR-Nachweis der LHCGR-mRNA in der Harnblase. Ein 158 bp langes Amplifikat des LHCGR (Exon 11) zeigt sich im weiblichen Ureter (**B**), in weiblichen (**C**) und männlichen (**D**) BPS/IC-Harnblasen und in weiblichen (**E**) und männlichen (**F**) Kontrollharnblasen. Plazenta (14.SSW) dient als Kontrolle für LHCGR-Expression (**A**). β -Aktin-Expression (361 bp) wird als Housekeeping-Gen in der Plazenta (**G**) verwendet.

4. Diskussion:

BPS/IC ist eines der physisch und psychisch schwersten Krankheitsbilder in der Urologie. Ständiger Harndrang und Schmerzen beim Wasserlassen belasten die Patienten und führen oft zu sozialen Problemen. Bislang gibt es aufgrund der unbekannten Pathogenese aber keine kausale Therapie, sodass viele Betroffene weiterhin leiden. Die Pathophysiologie von BPS/IC konzentriert sich hauptsächlich auf das Urothel, das mit fortschreitender Erkrankung zunehmend zerstört wird. Medikamente, die die Urothelintegrität verbessern, werden derzeit mit begrenztem Erfolg eingesetzt. Darum widmen sich viele Forschungsgruppen der Aufklärung der Pathogenese. Der Nachweis von erhöhtem β -hCG im Urothel erkrankter Harnblasen gibt Anlass zu der Vermutung einer (protektiven) Rolle dieses Hormons in der Urothelintegrität. Da hCG neben seiner Funktion als Schwangerschaftshormon auch differenzierende und wachstumssteigernde Eigenschaften auf Zellen hat, erscheint eine Rolle von hCG in der Urothelregeneration bei BPS/IC möglich. Deshalb hat die vorliegende Arbeit das Vorkommen und die Charakteristika seines Rezeptors im Urothel und Detrusor der Harnblase untersucht und sie mit Veränderungen in BPS/IC-Harnblasen verglichen.

Im Urothel und Detrusor von Harnblase und Ureter konnten unterschiedliche Verteilungsmuster des LHCGR in der Immunfluoreszenz definiert werden. Die Rezeptorexpression zeigte sich in diesen Organen auch in Strukturen der Lamina muscularis mucosae und den glatten Gefäßmuskelzellen. Altersverteilung und Expressionshöhe des LHCGR korrelierten nicht miteinander. Die quantitative Messung der Fluoreszenzintensitäten ergab eine signifikant stärkere Expression des Rezeptors im Urothel weiblicher BPS/IC-Harnblasen im Vergleich zu weiblichen Kontrollharnblasen. Im Detrusor hingegen konnte weder zwischen den Geschlechtern noch zwischen Kontroll – oder BPS/IC-Harnblase ein signifikanter Unterschied der Expressionshöhe ermittelt werden. Die Expression des LHCGR wurde hier das erste Mal geschlechtsunabhängig und frei von Bezügen zu Blasentumoren, Schwangerschaft oder Inkontinenz dargestellt. Sie erfolgte mittels PCR und Immunhistochemie in Harnblasen und Ureteren von beiden Geschlechtern.

4.1. Alterskorrelation

Die hier verwendeten Präparate zeigten keine Korrelation der Fluoreszenzintensitäten mit dem Patientenalter, weder im Urothel noch im Detrusor. Die bisher einzige Publikation über den LHCGR in der humanen Harnblase von Tao et al. wies hingegen semiquantitativ geringere Färbeintensitäten von postmenopausalen Harnblasenpräparaten im Vergleich zu prämenopausalen Präparaten auf. Die Autoren vermuteten daher erstmals einen Zusammenhang von erhöhtem LH und Blasenfunktionsstörungen wie Inkontinenz im Menschen (111). Da sich die endokrinologischen Regulationen von Menopause und Sterilisation entsprechen, lassen Untersuchungen an sterilisierten Hunden diesen Schluss ebenfalls zu. Das durch fehlende Feed-back-Mechanismen erhöhte GnRH sorgt für ansteigende LH und FSH-Spiegel, die in Korrelation zu neu aufgetretener Inkontinenz nach Sterilisation von Hunden stand [(112), (116)].

BPS/IC ist jedoch in aller Regel nicht mit Inkontinenz vergesellschaftet. Ebenso ist das Erkrankungsalter, anders als früher angenommen, nicht mehr mit dem Eintritt der Menopause assoziiert. Damit erscheint eine endokrinologische Regulation der Rezeptorexpression in der menschlichen Harnblase unwahrscheinlich und entspricht der in dieser Arbeit fehlenden Korrelation von Alter und Höhe der Immunfluoreszenz. Andererseits limitierte die begrenzte Präparateanzahl von prämenopausalen Frauen aufgrund der meist späten Diagnosestellung und die hier nicht untersuchten Blutwerte von LH und FSH zur Feststellung des Fertilitätsstatus die Aussagefähigkeit.

4.2. Der LHCGR im Urothel

5 unterschiedliche Verteilungsmuster des LHCGR im Urothel von Harnblasen und Ureteren beider Geschlechter konnten definiert werden. Dabei unterschied sich sowohl die subzelluläre Lokalisation des Rezeptors als auch die Verteilung zwischen den verschiedenen Zellschichten. Die verschiedenartigen Muster sprechen für die unterschiedliche Beteiligung des Rezeptors an der zellulären Differenzierung der verschiedenen Schichten. Außerdem unterschieden sich die Verteilungsmuster zwischen gesunden und erkrankten Urothelien, wodurch ebenfalls eine Rolle in der Urothelregeneration möglich scheint.

Harnblasen ohne BPS/IC zeigten in männlichen und weiblichen Präparaten vorwiegend apikale Rezeptorexpression. Sowohl Verteilungsmuster 1 (nur apikale Rezeptorexpression)

als auch Verteilungsmuster 3 (apikale und basale Rezeptorexpression) stellten den Hauptteil der Rezeptorlokalisierung dar. Insgesamt wiesen 7 von 11 weiblichen und 6 von 8 männlichen Urothelien diese Muster auf. Zudem zeigten noch intakte Urothelien von BPS/IC-Harnblasen (4 von 7 Präparaten) eine apikale Expression des Rezeptors. Die Dominanz des LHCGR vor allem in der Umbrellazellschicht könnte seine Entsprechung in der besonderen Aufgabe dieser spezialisierten Zellen (*siehe Kapitel 1.2.1.*) haben. Denkbar wäre eine Beteiligung des Rezeptors an der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion oder an der Regulation der Zellregeneration – und Differenzierung.

Bei genauerer Untersuchung der subzellulären Verteilung des Rezeptors in diesen Präparaten, fiel auf, dass gesundes Urothel mit vorwiegend apikaler Rezeptorfärbung keine perinukleäre Rezeptoranhäufung zeigte (Verteilungsmuster 1 und 3). Im intakten BPS/IC-Urothel hingegen konnte der LHCGR bei gleichzeitig starker apikaler Färbung zusätzlich feingranulär um die Zellkerne verteilt dargestellt werden (Verteilungsmuster 1). Außerdem lag bei defektem Urothel in BPS/IC-Harnblasen vorrangig Verteilungsmuster 5 mit der ausschließlich perinukleären Rezeptorfärbung vor. Diese resultierte wahrscheinlich aus dem Verteilungstyp des entsprechenden intakten BPS/IC-Urothels, da hier die rezeptorexprimierenden apikalen Zellschichten nicht fehlten. Durch die Erkrankung an BPS/IC könnte in allen Zellschichten die Synthese des Rezeptors verstärkt sein, sodass er vermehrt perinukleär (ER – und Golgi-Netzwerk als Ort der Rezeptorsynthese und -reifung) dargestellt werden könnte (58). Im Fall eines gesunden Urothels der Kontrollharnblasen würde sich die normale Syntheserate nicht als feingranuläre Verteilung um den Zellkern darstellen. Dies entspräche dem fehlenden Nachweis der perinukleären Rezeptoranfärbung bei Verteilungsmuster 1 und 3 in gesunden Harnblasen und der geringen Fluoreszenzintensität im gesunden weiblichen Urothel. Andererseits zeigten auch gesunde Urothelien Verteilungsmuster 5. Möglicherweise wurde die Rezeptorexpression hier durch andere Pathologien oder eine Vorform von BPS/IC beeinflusst.

Verteilungsmuster 4 könnte eine abnorme Form der Rezeptorexpression sein. Der Rezeptor konnte weder einer bestimmten Zellschicht zugeordnet noch innerhalb der Zellen genau lokalisiert werden, sondern erschien diffus und ohne Präferenz über das gesamte Urothel verteilt. Da dieses Muster weder in männlichen noch in weiblichen Kontrollharnblasen gefunden wurde, sich jedoch in einigen BPS/IC-Urothelien zeigte, lag vermutlich eine pathophysiologische Regulation mit veränderter und unkoordinierter Rezeptorexpression vor.

Ein typisches Modell für zelluläre Differenzierung stellt das Vaginalepithel dar. Hier konnte der LHCGR mittels Immunfluoreszenz entlang zunehmender Differenzierung der Zellen in unterschiedlichen Kompartimenten der Zellschichten gezeigt werden. Basal wurde kein Rezeptor detektiert, während die Parabasalzellen zytoplasmatische Rezeptorexpression zeigten. Im weiteren Differenzierungsprozess der Zellen konnte der Rezeptor perinukleär und zellmembranständig angefärbt werden. In den unteren Superfizialzellen beschränkte sich die Rezeptorexpression auf die Kernregionen und war schließlich in den verhornten Superfizialzellen nicht mehr nachweisbar. Damit konnte im Vaginalepithel kein Rezeptor in den Stammzellen oder den ausdifferenziertesten Zellen des Epithels nachgewiesen werden (117). Im Gegensatz dazu zeigte das Urothel sowohl in den Stammzellen als auch in den Umbrellazellen, die die Endstufe des zellulären Differenzierungsprozesses darstellen, eine deutliche Rezeptorfärbung. So stellen das Urothel, wie auch das Vaginalepithel, ein potentiell Ziel für durch hCG oder LH vermittelte Wirkungen dar.

Dieses Modell veranschaulicht, dass der LHCGR als GPCR nicht nur auf die Zellmembranen beschränkt ist, sondern auch in unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen angefärbt werden kann. Die Bedeutung dieser untypischen Verteilung bleibt zwar weiterhin spekulativ, scheint jedoch die These von der Beteiligung an der zellulären Differenzierung zu stützen. Denkbar ist somit eine Rezeptoraktivierung nicht nur der zellmembrangebundenen LHCGR-Fraktion, sondern auch der noch intrazellulär vorliegenden Rezeptoren. Denn im Gegensatz zum FSHR kann der LHCGR auch in den Zellen seine Liganden noch binden (118). Diese können über andere second-messenger-Systeme als den klassischen Gs-Signalweg ihre Wirkung vermitteln. Wie im Kapitel „1.3.4. *Signalweiterleitung*“ bereits angeschnitten, existieren verschiedene Aktivierungswege des LHCGR, die nicht zwangsläufig einen zellmembrangebundenen Rezeptor benötigen. In Anlehnung an Sexualsteroiden, die über nukleäre Rezeptoren wirken, könnte die nukleäre Expression des LHCGR ebenfalls Ausdruck dieser direkteren Aktivierung der Proteinsynthese sein. Auch Bukovsky et. al. vermuteten, dass zytoplasmatische und nukleäre Rezeptorexpression, wie sie beispielsweise im Verteilungsmuster 5 des Urothels zu sehen war, Ausdruck dieser Aktivierungswege sein könnte (117). Zusätzlich könnten sie eine Möglichkeit darstellen, auf hohe Konzentrationen an Liganden anzusprechen, wie sie während einer Schwangerschaft (117) oder auch bei BPS/IC (59) vorkommen.

In den verschiedenen Zellen des Ovars unterschied sich ebenfalls die zelluläre Verteilung des LHCGR. Theka interna-Zellen und Granulosazellen zeichneten sich durch zytoplasmatische und zellmembrangebundene Rezeptorlokalisationen aus, während sich der Rezeptor in Stromazellen nukleär verteilte (65). Ebenso untypisch aufgrund der zytoplasmatischen Lokalisation des LHCGR war seine Expression im Urothel von Hunden (69). Die unterschiedliche Verteilung des Rezeptors auch in gonadalen Geweben spricht für weitere Funktionen des LHCGR, die bislang noch weitgehend unverstanden sind.

Um genauer zu untersuchen, ob die Verteilung des LHCGR im Urothel mit dessen Differenzierungszustand zusammenhängt, wäre eine Korrelation der unterschiedlichen Differenzierungsgrade über spezielle Zellmarker mit den Fluoreszenzmustern des Rezeptors im Urothel nötig. Zudem ist eine Studie vorstellbar, die den Schädigungsgrad der BPS/IC-Urothelien (z.B. nach Slobodov et al., (54)) mit den gefundenen Verteilungsmustern vergleicht. Dazu müssten aus einer Harnblase mehrere Biopsien von unterschiedlichen Stellen entnommen werden, um repräsentativ den Urothelzustand beschreiben zu können, was in der vorliegenden Arbeit leider nicht gegeben war.

Die Rezeptorexpression im gesunden Urothel unterschied sich nicht zwischen männlichen und weiblichen Harnblasen und war gegenüber den weiblichen BPS/IC-Urothelien signifikant geringer. Damit zeigte sich eine geschlechtsunabhängige basale Expressionsrate des LHCGR in der gesunden Harnblase, die mit der bereits nachgewiesenen Grundfluoreszenz von hCG in ebenfalls gesunden Urothelien beider Geschlechter korrelierte (59). Hormon und Rezeptor scheinen also unter physiologischen Bedingungen eine grundlegende Rolle in der Harnblase zu spielen. Männliche BPS/IC-Urothelien konnten aufgrund ihrer geringen Präparatezahl nicht in die Auswertung einbezogen werden. Lohnenswert ist die Untersuchung mit einer größeren Präparategruppe, um die Geschlechtsspezifität der Erkrankung herauszustellen oder sie gegebenenfalls zu korrigieren. Die Rezeptorexpression in weiblichen BPS/IC-Urothelien war gegenüber den entsprechenden Kontrollharnblasen signifikant erhöht. Da gleichzeitig auch die urotheliale Expression von hCG in BPS/IC-Harnblasen verstärkt war (59), scheint es eine positive Korrelation im Sinne einer up-Regulation des LHCGR bei dauerhaft hoher Ligandenexposition zu geben. Diese Erkenntnis ist ein wichtiger Schritt in der Aufklärung der Beteiligung des LHCGR an der Krankheitsentstehung von BPS/IC. Denn ebenso denkbar wäre eine verminderte Expression des LHCGR bei hohen Ligandenleveln gewesen, wie sie im adulten Hoden vorkommt. Im Gegensatz dazu zeigten sowohl fetale als auch präpubertäre

Hoden das gleiche Rezeptorverhalten wie das Urothel bei BPS/IC: sie exprimierten verstärkt den LHCGR (80). Dies könnte also ein weiterer Hinweis auf die fehlende Differenzierung der Zellen und dem Einfluss des LHCGR in diesen Entwicklungsphasen sein. In Rattenovarien konnte durch hCG eine Mevalonatkinase induziert werden, die die mRNA des Rezeptors abbaut (119). Sollte hCG bei BPS/IC verändert sein (59), könnte diese Kontrolle des negativen Feed-backs fehlen. Die dadurch in größerer Zahl translatierten LHCGRs würden sich demnach in der stärkeren Immunfluoreszenz der weiblichen BPS/IC-Urothelien widerspiegeln. Ob das erhöhte Rezeptorvorkommen allerdings aus funktionellen Rezeptoren besteht, ist ebenso wie bei BPS/IC noch nicht weiter untersucht. Darum könnten die höheren Rezeptorwerte auch auf eine vermehrte Bildung defekter Rezeptoren zurückzuführen sein. Das entspricht den neueren Vorstellungen von der Desensitivierung der Zielzellen über defekte, trunkierte oder intrazellulär retendierte Rezeptoren statt der üblichen Entkopplung vom G-Protein. Darauf wird im Folgenden am Beispiel von bisher gefundenen Rezeptorvarianten genauer eingegangen, da der LHCGR durch seine vielen Transkripte prädestiniert für diese Art der Zellregulierung zu sein scheint. Über verschiedene Mechanismen wie alternatives Splicing, unterschiedliche Polyadenylierungen oder mehrere Transkriptionsstartseiten entstehen viele verkürzte Varianten des LHCGR [(74), (80)]. Die Anzahl der Rezeptorformen war dabei abhängig vom untersuchten Gewebe und der Nachweismethode (74). Beispielsweise konnten Madhra et al. mittels PCR nur 3 Varianten im Ovar detektieren (120), während es Bukovsky et. al. gelang, 6 Formen des LHCGR mittels Western Blot zu unterscheiden (117). Auch innerhalb der bisher untersuchten Gewebe unterschieden sich die Splicingmuster. So zeigten Rattenhoden je nach Differenzierungsstadium der Leydigzellen (121) oder das Endometrium in Abhängigkeit der Zyklusphase verschiedene Rezeptorvarianten (70). Ebenso waren in Granulosazelltumoren je nach Tumorstadium und -größe verschiedene Transkripte nachweisbar (81). Für einige dieser Formen steht aber der Nachweis eines tatsächlich gebildeten Proteins im menschlichen Organismus noch aus, auch wenn sie teilweise schon von transfizierten Zellen translatiert wurden (122). Darum ist eine abschließende Aussage zur Anzahl der Rezeptorformen noch nicht möglich.

Auch mit den in dieser Arbeit verwendeten Techniken der Immunhistochemie und der PCR konnte die Differenzierung verschiedener Varianten nicht erfolgen. Beide Methoden zeigten zwar das Vorliegen des LHCGR im Urothel und Detrusor der Harnblase, allerdings detektierten sie nur einen Teil von Exon 11. Dabei wurde der Rezeptor zum einen in der PCR

durch ein 158 bp langes Amplifikat der TMD und andererseits durch die Bindung des LHCGR-Antikörpers an den intrazellulären C-Terminus (Immunfluoreszenz) nachgewiesen. Damit könnten also sowohl der komplette Rezeptor als auch mögliche verkürzte Varianten dargestellt worden sein.

Noch unveröffentlichte Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten den LHCGR auch mittels nested-PCR im Urothel nachweisen. In Anlehnung an Licht et. al. (70) erfolgte dabei die Darstellung von 3 verkürzten Rezeptorvarianten neben dem vollständigen LHCGR. Die nested-PCR ist ein sensitiveres Verfahren als die Standard-PCR und kann auch geringe Mengen einzelner Splicevarianten detektieren, die der Standard-PCR entgehen würden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass vorwiegend trunkierte Varianten und kaum vollständige Rezeptoren (nur 2 von 17 Harnblasen) exprimiert werden. Das könnte bedeuten, dass einerseits die komplette Rezeptorform in sehr geringen Mengen vorliegt und ein noch sensitiveres Verfahren als die nested-PCR angewendet werden muss, um diese Form zu erfassen. Andererseits könnten die verkürzten Formen Ausdruck einer fehlerhaften oder veränderten Rezeptorsynthese sein und auf noch unbekannte Weise neue Funktionen in den Urothelzellen erfüllen. Außer dem kompletten Rezeptor, wird keine in der nested-PCR erkannte Variante durch die Immunfluoreszenz detektiert, die daher keinen Aufschluss über die subzelluläre Lokalisation dieser Varianten geben konnte. Andersherum durften die fluoreszierenden Rezeptoren auch nicht zwangsläufig mit dem kompletten Rezeptor gleichgesetzt werden, sondern können ebenfalls trunkierte Varianten darstellen, die nicht mit der nested-PCR erfasst wurden.

Bisher wurden über die Aufgabe und Funktion aller Rezeptorvarianten des LHCGR nur Vermutungen angestellt. Einige könnten an der Rezeptorselfregulation beteiligt sein. Denn neuere Forschungen ziehen zusätzlich zu den bereits erwähnten Steuerungsmechanismen (*siehe Kapitel 1.3.3.*) des Entkoppelns und der down-Regulierung andere Wege der Rezeptorkontrolle in Betracht. Beispielsweise könnte auf Ebene der mRNA die Entstehung verschiedener Splicevarianten zu nichtfunktionalen oder trunkierten Rezeptoren gesteuert werden (123). (Tier-)modelle bieten verschiedene Möglichkeiten an. Sehr stark trunkierte Rezeptorvarianten bestehen nur aus der EZD. Diese fanden sich sowohl in verschiedenen Tieren [(117), (119)] als auch in mehreren humanen Geweben [(70,119)] und konnten mittels nested-PCR auch im Urothel gefunden werden. Untersuchungen zeigten einerseits die Sekretion solcher Varianten [(80), (122)], aber auch deren intrazellulären Verbleib (125).

Damit ergeben sich unterschiedliche Möglichkeiten für die Funktionen der trunkierten Rezeptoren. Zum einen ist es möglich, dass sie außerhalb der Zellen noch ungebundene Liganden binden und diese dem membranständigen LHCGR präsentieren können (122). Auf der anderen Seite können die Rezeptorvarianten aber auch die Bindung von freiem Ligand an membrangebundene Rezeptoren verhindern und auf diese Weise zur Regulierung des Rezeptors beitragen (120). Die Funktion von löslichen Rezeptorvarianten könnte aber auch, neben der Steuerung der Hormonlevel, eine Art Hormonreservoir sein, wie es für den IL-4-Rezeptor bekannt ist. Der LHCGR könnte dafür sorgen, dass weniger Liganden im Blutstrom abgebaut werden, indem der Rezeptor stabilisierend auf LH oder hCG wirkt (126).

Dickinson et al. konnten in COS-7-Zellen die trunkierte Variante des LHCGR ohne TMD und IZD exprimieren und zeigten dabei deren intrazellulären Verbleib. Bei Stimulierung dieser Zellen mit hCG verringerte sich die Anzahl des mutierten Rezeptors, der auch die Expression des kompletten Rezeptors beeinflussen konnte. Versuche mit Zellen, in die beide Rezeptoren (kompletter und trunkierter Rezeptor) transfiziert wurden, zeigten ein verändertes Expressionsmuster des vollständigen Rezeptors. Die Immunfluoreszenz änderte sich von zellmembranständig und diffus perinukleär, wenn die komplette Form allein exprimiert wurde, zu ausschließlich intrazellulär, wenn zusätzlich die trunkierte Variante des LHCGR koexprimiert wurde (119). Weiterhin zeigte die Koexpression beider Varianten keine cAMP-Produktion bei LH-Stimulierung, sodass man davon ausging, dass die trunkierte Variante den vollständigen Rezeptor hemmen konnte (119). Diese Versuche zeigten, dass sich die verkürzte Variante sowohl durch hCG regulieren ließ, als auch, dass sie selbst andere Rezeptorvarianten beeinflussen konnte. Die hier dargestellten immunhistochemischen Färbungen konnten den Rezeptor im Urothel ebenfalls zellmembranständig wie im Verteilungsmuster 1 oder 3 und diffus perinukleär wie im Verteilungsmuster 5 anfärben. Die trunkierte Variante von Dickinson et al. wurde allerdings nicht dargestellt, da ihr der intrazelluläre Teil des Rezeptors, an den der hier verwendete AK gebunden wurde, fehlt. Wenn aber vollständiger und trunkierter Rezeptor als intrazellulärer Komplex vorliegen würden, könnte die Immunfluoreszenz diese über den C-Terminus des vollständigen Rezeptors detektieren. Dies würde der zytoplasmatischen Färbung des Rezeptors in den Verteilungsmustern 1 und 3 entsprechen, denn auch die nested-PCR zeigte in mehreren Harnblasen die Rezeptorvariante ohne TMD oder IZD. Der bei Dickinson et al. gezeigte Umschwung in der Rezeptorexpression kann auch auf die hier verwendeten Präparate übertragen werden. Denn das fast ausschließliche Auftreten von perinukleärer

Rezeptorexpression in BPS/IC-Harnblasen könnte für einen intrazellulär retendierten Rezeptorkomplex sprechen. Dieser könnte sich durch nur bei BPS/IC auftretende trunkierte Rezeptorformen bilden, die möglicherweise durch hCG bedingt oder reguliert sind. Denn normalerweise wird der humane LHCGR sehr effektiv prozessiert, sodass nur etwa 20% als unreife Vorformen intrazellulär vorliegen (127). Vorstellbar wäre ein defektes Prozessing bei BPS/IC, sodass in den Urothelzellen viel mehr unreife intrazelluläre Rezeptoren als unter physiologischen Zuständen vorliegen. Dies könnte den Wechsel der Rezeptorexpression von zellmembranständig zu vorwiegend intrazellulär (perinukleär), also Verteilungsmuster 5, und die höheren Werte der Rezeptorexpression in weiblichen BPS/IC-Urothelien erklären. Zur Korrelation von PCR und Immunhistochemie bietet sich die Rezeptorfärbung mit einem gegen die EZD des LHCGR gerichteten AK an. Ein Vergleich dieser neuen Färbungen mit denen des C-terminalen AK könnte Aufschluss darüber geben, ob trunkierte Varianten intrazellulär vorliegen und sich die Komplexe aus vollständigem und trunkiertem Rezeptor in gleicher Weise darstellen. Die Annahme eines trunkierten Rezeptors würde auch den vermuteten Einfluss des in der Harnblase exprimierten hCG auf das Urothel unterstützen. Einerseits könnte die verkürzte Rezeptorform das Ansprechen des LHCGR auf hCG verhindern, da sie selbst das Signal nicht weiterleiten kann. Dadurch würde dessen differenzierende Wirkung abgeschwächt werden und das Urothel bliebe weiterhin zerstört. Andererseits könnte durch vorhandenes hCG die trunkierte Variante vermindert und so die Hemmung, die diese Variante auf den vollständigen Rezeptor ausübt, aufgehoben werden. Damit würde sich die Anzahl der kompletten Rezeptoren in der Zellmembran erhöhen und folglich auch die Effektivität der Zelle auf Liganden reagieren zu können. Dies kann durch die Ergebnisse der quantitativen Auswertung der Rezeptorexpression gestützt werden. Hier zeigte sich eine signifikant erhöhte Immunfluoreszenz im Urothel weiblicher BPS/IC-Harnblasen gegenüber den weiblichen Kontrollharnblasen.

Auch für andere Rezeptorvarianten des LHCGR konnte eine intrazelluläre Komplexbildung gezeigt werden. Transkripte ohne Exon 9, die mit noch unbekannter Funktion auch physiologischer Weise im humanen Ovar vorkommen, zeigten beispielsweise dieses Verhalten mit dem vollständigen LHCGR (128). Solche Komplexe regulierten die Dichte des vollständigen Rezeptors in der Zellmembran, indem die trunkierte Rezeptorvariante an unreife Vorläufer-LHCGRs band und diese Komplexe in den Lysosomen degradiert wurden. Dimerisierungen von GPCRs mit ihren gesplitten Varianten sind ein typisches Verhalten dieser Rezeptorfamilie, wobei die Wirkungen verschieden sind. Beispielsweise führte die

Koexpression von Dopamin Typ 3 Rezeptor und seiner verkürzten Variante zu antagonistischen Wirkungen, indem die Komplexe die Ligandenbindung an den kompletten Rezeptor behinderten. Die Rezeptorvariante des LHCGR ohne Exon 9 wies im Vergleich zum kompletten Rezeptor keine Fähigkeit zur hCG-Bindung auf [(128), (129)] und wurde nicht in die Zellmembran eingebaut (129). Damit würde sie ein Ansprechen der Urothelzellen auf hohe Level an hCG, wie sie bei BPS/IC vorkommen (59), verhindern und eine Überstimulierung der Zellen vermeiden. Diese Variante könnte mit der Immunfluoreszenz und auch der Standard-PCR erfasst und dargestellt worden sein, da Exon 11 nicht beeinträchtigt ist. Verteilungsmustern 1 oder 5 der Immunfluoreszenz wären so erklärbar. An dieser Stelle müssten genauere Untersuchungen angestellt werden, um den LHCGR ohne Exon 9 nachzuweisen, beispielsweise mittels Westernblot oder mit Primern, die um Exon 9 gelagert werden.

Da weder mit der Immunfluoreszenz noch mit der Standard-PCR der Nachweis eines kompletten LHCGR möglich war, könnte neben dem vollständigen Rezeptor auch eine Variante mit verkürzter IZD vorliegen. Versuche mit Ratten-LHCGR, denen unterschiedlich lange Stücke der IZD fehlten, könnten als Beispiel für diese im Exon 11 trunkierte Form dienen. Sie zeigten in Abhängigkeit der erhaltenen Restlänge der IZD höhere Bildungsraten an cAMP im Vergleich zur Stimulierung des kompletten Rezeptors. Da sie nicht vom G-Protein entkoppelt werden konnten, verloren die Zellen einen Teil ihrer Regulierbarkeit. Die Bindungsaffinität zu hCG unterschied sich dabei nicht zwischen diesen Formen des LHCGR. Eine Variante mit extremer Verkürzung des zytoplasmatischen Rezeptorteils wurde zudem nicht in die Zellmembran eingebaut und verblieb intrazellulär. Dennoch konnten die Zellen mit anderen Mechanismen als der Entkopplung vom G-Protein auf eine hohe Dauerstimulation mit hCG reagieren. Sie internalisierten und degradierten die verkürzten Varianten des hCG-LHCGR-Komplex viel schneller als die Ligand-Rezeptor-Komplexe des kompletten LHCGR [(130), (131)]. Diese Varianten konnten das Ligandensignal verstärken und für einen schnelleren Umsatz des Rezeptors (Internalisierung-Recycling/Abbau) sorgen und implizieren damit die Möglichkeit stärker auf Hormone reagieren zu können.

Zusammenfassend können Splicevarianten auf vielfältigen Wegen regulierend auf den kompletten LHCGR einwirken. Zum einen vermindern sie durch intrazelluläre Retention, v.a. im ER, die Höhe der Rezeptoren in der Zellmembran (z.B. Mutationen im Exon 11) [(119), (132)]. Zum anderen können lösliche Varianten das Ligandenverhalten kontrollieren.

Entweder schwächten sie deren Wirkung ab, indem kurze LHCGRs hCG oder LH banden und diese dem zellmembranständigen Rezeptor nicht mehr zur Verfügung standen (120). Sie erleichterten aber auch durch eine bessere Präsentation der Liganden die Bindung der Liganden an den Rezeptor und verbesserten die Signalverarbeitung (122). Desweiteren konnten bestimmte Isoformen durch Komplexbildung mit dem kompletten Rezeptor diesen inaktivieren und dadurch das Ansprechen der Zellen auf Liganden verändern (81). Interessant erscheint die Möglichkeit, dass sich die Affinität von hCG zu verschiedenen Rezeptortranskripten unterscheidet und die Rezeptorexpression auch auf diese Weise reguliert werden könnte (119). Im humanen Ovar wurde sogar die Möglichkeit einer hormonellen Regulation der Splicevariantenexpression diskutiert [(119), (123)], die auch im Urothel durch hCG übernommen werden könnte.

Da so viele mögliche Splicevarianten und Arten der Regulierung wahrscheinlich existieren, scheinen sie eine große Rolle für die Funktionalität des LHCGRs bei unterschiedlichen Zellzuständen zu spielen. Als Beispiel seien Veränderungen bei Krankheiten wie Granulosazelltumoren angeführt, die je nach Tumorstadium andere Transkripte exprimierten (81). Diese Zusammenhänge sollten bei BPS/IC genauer untersucht werden und könnten Hinweise auf die Pathogenese der Krankheit liefern. Weiterhin können Rückschlüsse über die Regulationsmöglichkeiten des LHCGR und die Funktion seiner Splicevarianten im Allgemeinen gezogen werden.

4.3. Der LHCGR im Detrusor

In den Zellmembranen und im Zytoplasma glatter Muskelzellen der Harnblase und des Ureters konnte der LHCGR mittels Immunfluoreszenz ebenfalls nachgewiesen werden. Bukovsky et al. zeigten die Expression des Rezeptors in Kernnähe und im Zytoplasma der vaginalen Muskulatur (117), Környei et al. wiesen ihn im Myometrium nach (133) und Welle et al. konnten im Detrusor von Hunden eine diffuse zytoplasmatische Verteilung des LHCGR finden (69). Versuche zeigten, dass hCG über seinen Rezeptor muskelrelaxierend in diesen Geweben wirkte [(116), (117)], die Dichte glatter Muskelzellen *in vitro* verstärkte und die Zellgröße bestimmter Muskelzellpopulationen steigerte (133). Über die Induktion von COX-2 wie im Epithel des Uterus und die Produktion verschiedener Prostaglandine wie PGE₂ könnte der LHCGR sowohl Muskelkontraktionen als auch -relaxationen auslösen (116). Andererseits

sind solche Prostaglandine auch an der Entzündungsreaktion beteiligt und könnten so einen Teil der Pathophysiologie von BPS/IC darstellen.

Die Fluoreszenzintensitäten in der Immunhistochemie zeigten weder zwischen männlichen und weiblichen Kontrollblasen noch zwischen Kontroll - und BPS/IC-Blasen von weiblichen Präparaten einen signifikanten Unterschied. Männliche BPS/IC-Harnblasen konnten wegen der geringen Präparateanzahl (n=3) nicht in die Auswertung miteinbezogen werden. In Harnblasen von Hunden konnten auch Ponglowhapan et al. keinen Unterschied der Detrusorexpression des LHCGR zwischen weiblichen und männlichen Hunden finden (116). Coit et al. stellten eine negative Korrelation zwischen der Höhe der LHCGR-mRNA und der Kontraktilität der Harnblasenmuskulatur von Hunden *in vitro* her. Die verminderte Kontraktilität führte zu Residualvolumen und verlängerter Speicherphase des Urins, wodurch das Risiko einer Zystitis stieg (112). Zumindest scheint der Einfluss des LHCGR auf glatte Muskelzellen (Kontraktilität und Zellzahl) wichtig für die Blasenfunktion an sich zu sein (116). Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass auch die glatte Muskulatur der Ureteren den LHCGR exprimierte. Da sich die LHCGR-Expression im Urothel zwischen gesunden und erkrankten weiblichen Harnblasen unterschied, im Muskel jedoch immer gleich war, unterstützt es die Vermutung, dass der Rezeptor hauptsächlich auf das Urothel wirkt.

GPCRs galten lange Zeit als typische Vertreter der Rezeptormonomere, wobei jeder Rezeptor von einem Ligand aktiviert wird. Für immer mehr GPCRs konnte gezeigt werden, dass sie als Di - oder Oligomere vorliegen und diese Rezeptorzusammenschlüsse (Cluster) wichtig für Funktionen wie Affinität, Spezifität oder Effizienz der Rezeptoren sind. Je nach Rezeptor kommen Homo – oder Heterodimere, kovalente oder nicht-kovalente Verbindungen, Dimerisierungen während der Rezeptorbiosynthese oder bei Agonistbindung, aber auch in Abhängigkeit der Rezeptordichte vor [(128), (129)]. Heterodimerisierungen von β_1 - und β_2 -adrenergen Rezeptoren inhibierten zum Beispiel den MAPK-Signalweg des β_2 -adrenergen Rezeptors (134). Bereits 1987 ließen Untersuchungen darauf schließen, dass der LHCGR als nicht-kovalentes Homodimer im funktionellen Zustand vorliegt (135). Ji et al. entwarfen ein Modell der Cis – und Transaktivierung des Rezeptors als Mono - oder als Dimer. Die Signaltransduktion konnte so auch zwischen 2 Mutanten gezeigt werden, die separat nicht funktionstüchtig waren. Dabei enthielt eine Rezeptorvariante eine nichtfunktionelle IZD, während die andere aus einer unbrauchbaren EZD bestand. Hormonbindung der einen Variante konnte die Signaltransduktion der anderen Variante auslösen (136). So könnten auch

die trunkierten Formen durchaus in der Lage sein, das Signal an andere Mutanten weiterzuleiten.

Elektronenmikroskopisch und immunhistochemisch konnte die Aggregation des LHCGR in Clustern durch Agoniststimulierung gezeigt werden [(137), (138)]. Auch die Ergebnisse dieser Arbeit legten, durch die unterschiedlichen Größen der angefärbten Rezeptoren im Detrusor, eine Clusterung des LHCGR nahe. Mittels Immunfluoreszenz konnten verschiedene Verteilungen der Rezeptorcluster im Detrusor definiert werden, die sich hinsichtlich Größe und Anzahl rein optisch voneinander unterschieden. Dabei stellten sich sowohl feingranuläre Abschnitte (zytoplasmatisch) als auch größere Cluster nebeneinander dar. In gesunden weiblichen Kontrollharnblasen lagen schwache Zytoplasmafärbung mit einigen Clustern und mittelstarke Zytoplasmafärbung mit vielen Clustern zu gleichen Teilen vor. Im Detrusor von weiblichen BPS/IC-Patientinnen hingegen zeigten 3 von 4 Präparaten das schwach gefärbt Zytoplasma mit mäßigem Clusteranteil. Diese Umverteilung der Rezeptorexpression ließ jedoch nicht auf eine insgesamt geringere Rezeptorzahl bei BPS/IC schließen, da die quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensitäten keine Unterschiede zu gesunden Detrusorpräparaten aufzeigen konnte. Vielmehr schien sich die zelluläre Organisation des Rezeptors zu verändern. Wie auch bei den Urothelien, konnten die männlichen BPS/IC-Präparate nicht repräsentativ ausgewertet werden. Zwischen weiblichen und männlichen Kontrollharnblasen lagen weitere Unterschiede vor, wobei im männlichen Detrusor das Verteilungsmuster mit der schwachen Zytoplasmafärbung und mäßigem Clustervorkommen stark überwog. Die quantitative Auswertung der Rezeptorcluster konnte allerdings keine signifikant unterschiedliche Verteilung zwischen gesunden und kranken und zwischen männlichen und weiblichen Harnblasen zeigen. Auch die Fluoreszenzintensitäten änderten sich zwischen den untersuchten Gruppen nicht. Da sich Größe und Verteilung der Cluster in der Immunfluoreszenz unterschieden, sich die absolute Anzahl der Rezeptoren im Detrusor allerdings nicht veränderte, könnte dies der Rezeptoraggregation in Rafts in unterschiedlichen Stadien entsprechen. Dabei bleibt die absolute Rezeptorzahl in der Zellmembran gleich, aber die Anordnung der Rezeptoren zueinander würde sich verändern. Ob diese Rezeptoroligomere aus mehreren funktionellen Rezeptoren bestehen oder Zusammenschlüsse verschiedener trunkierter und intrazellulär retendierter Rezeptorvarianten darstellen, muss in weiteren Studien erst noch untersucht werden. Ebenso sollte die mögliche Rolle des LHCGR in der Regulierung der Zellfunktion in der gesunden Blasenmuskulatur und bei BPS/IC weiter intensiv erforscht werden.

4.4. Der LHCGR im Stroma und in Gefäßen

In der Lamina propria von Harnblase und Ureter konnte der Rezeptor ebenfalls immunhistochemisch nachgewiesen werden. In dieser Struktur verlaufen Gefäße und Nerven, die auf unterschiedliche Art und Weise an der Pathophysiologie von BPS/IC beteiligt sind. Der Nachweis des LHCGR in den Gefäßwänden des Harntraktes reihte sich in die Entdeckungen von Bukovsky et al. und anderen Forschungsgruppen ein, die die Expression des Rezeptors in den Gefäßen verschiedener anderer Gewebe beschrieben haben. Dazu gehörten Gefäße des Uterus, des Gehirns oder der Haut, außerdem zeigten auch andere Elemente der Lamina propria der Vagina den Rezeptor (117). In Hunden wurde der LHCGR in den Gefäßen der Haut und der Harnblase nachgewiesen (69). Es schien einen Unterschied zwischen den Gefäßen der eigentlichen Zielorgane (Ovar und Hoden) und denen der extragonadalen Gewebe zu geben. Da in den Endothelien der Ovarien immunhistochemisch kein Rezeptor nachgewiesen werden konnte, vermuteten Bukovsky et al. eine regulierende Funktion der vaskulären LHCGRs. Durch seine Expression in extragonadalen Gefäßen könnte er den Ligandentransport in die Zielgewebe bzw. in den extravaskulären Raum verhindern (117). Damit könnten die Liganden nur in Gewebe ohne vaskuläres LHCGR-Vorkommen gelangen, also in Ovar und Hoden. Unterstützend sah Bukovsky auch die geringe Größe von LH und hCG, die ohne weiteres die Gefäßbarriere überwinden könnten und daher eher von gewissen Strukturen ferngehalten werden müssten (117).

Der Nachweis des LHCGR in Gefäßendothelien könnte auch von therapeutischem Interesse sein. Um Medikamente gezielt zu den Zielzellen navigieren zu können, wurden sie an spezifische Rezeptor-AK-Komplexe gekoppelt. Diese Komplexe konnten an Gefäßendothelien transzytiert und im Gewebe freigesetzt werden. Beispiele sind die Kopplung von Therapeutika an anti-Transferrinrezeptor-AK, die dann gezielt und in höheren Dosen die Bluthirnschranke passieren konnten (139). Ghinea et al. konnten in Gefäßen des Rattenhodens ebenso die Transzytose von anti-LHCGR-AK zeigen. Damit wäre auch hier eine therapeutische Nutzung denkbar, indem Medikamente an den Rezeptorantikörper fusioniert werden und so über die Gefäßbarriere gelangen. Zudem könnte man spezifisch Gewebe ansprechen, in denen der LHCGR in Gefäßendothelzellen exprimiert wird (140). Außerdem war die Effektivität der Transzytose temperaturabhängig (141) und konnte *in vitro* durch zusätzliche Verabreichung seiner Liganden gesteigert werden (140). Dies könnte bei

zukünftigen Studien hilfreich sein und bei der Entwicklung und Anwendung möglicher Medikamente bedacht und ausgenutzt werden.

Mir sind keine Publikationen zum LHCGR im humanen Ureter oder denen anderer Tiere bekannt. Dennoch ließ die Expression des Rezeptors in der Urethra von Hunden vermuten [(113), (116)], dass der LHCGR ubiquitär im Urothel und anderen Strukturen der Harnwege vorkommt, um dort eine für die Funktionalität des Harntraktes wichtige Aufgabe zu erfüllen.

4.5. Der LHCGR in Bezug zur Pathophysiologie von BPS/IC

Mastzellen spielen eine wichtige Rolle in der Entzündungsreaktion bei zumindest einem Teil der BPS/IC-Patienten. Bei Mastzellaktivierung freigesetztes TNF- α verminderte die mRNA des LHCGR und damit die Rezeptorzahl im Corpus luteum von Ratten. Dadurch wurde letztlich die Wirkung von LH auf die Produktion von Östrogenen und Progesteron verhindert (112). Im Menschen konnte allerdings bei Takao et al. kein Effekt von TNF- α auf die LHCGR-Expression in Granulosazellen *in vitro* nachgewiesen werden (65). Da bei BPS/IC das TNF- α vermindert ist (33), wäre ein Stimulationsversuch von Urothelzellkulturen zur Untersuchung der Abhängigkeit beider Faktoren von Interesse. Andererseits sind bei einigen BPS/IC-Patienten mehr Mastzellen aktiviert und deren freigesetztes TNF- α könnte die Expression des Rezeptors in der Zellmembran vermindern.

Auch andere Entzündungsmediatoren wechselwirken mit dem Rezeptor. Bei der Ovulation konnte durch den LH-Anstieg das Enzym COX-2 induziert und die Synthese von Prostaglandinen angeregt werden (142). Für hCG sind ebenfalls immunmodulatorische Eigenschaften bekannt, die u.a. die Entzündungsreaktionen Richtung TH₂-Antwort verschoben und die Expression von Makrophagen verminderten (102). Diese zeigten im Gehirn (Mikroglia), im Ovar oder im Endometrium die Expression des LHCGR und konnten durch LH bzw. hCG zur Zytokinproduktion angeregt werden (117). Somit könnte der LHCGR an der Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion bei BPS/IC beteiligt sein, wobei der Nachweis der LHCGR-Expression auf Makrophagen in der Harnblase noch aussteht. In Rattenhoden führte hCG-Stimulation zur Entwicklung einer entzündungsähnlichen Reaktion mit Leukozytenmigration und gesteigerter Gefäßdurchlässigkeit. Es wirkte chemoattraktiv auf Lymphozyten, Monozyten oder Granulozyten (143). Wurden LHCGR-tragende Leukozyten mit ansteigenden Dosen LH behandelt, zeigten sie einen Anstieg der NO-

Produktion und schließlich die Autolyse der Leukozyten (144). Da das Urothel bei BPS/IC sowohl erhöhte Werte an NO (24) als auch zerstörte Zellen aufweist (54), könnte der LHCGR an der Urothelschädigung beteiligt sein oder durch Bildung nichtfunktioneller oder intrazellulärer Varianten die Zellen vor erhöhter NO-Produktion bewahren. Deshalb erscheint es sinnvoll die Rolle des LHCGR auch bei anderen Entzündungen der Harnblase bzw. seine allgemeine Rolle bei der Entzündungsreaktion weiter zu erforschen. Untersuchungen dazu im Stroma von Harnblasen (beispielsweise an Makrophagen) könnten den Circulus vitiosus von Entzündung und Schmerz bei BPS/IC unterbrechen helfen.

Ein Charakteristikum von BPS/IC ist die vermehrte Innervation der Harnblase [(1), (12)]. In Ratten konnte der LHCGR sowohl im PNS als auch im ZNS nachgewiesen werden. Er scheint an Wachstum und Entwicklung von Nerven beteiligt zu sein, da er sowohl in fetalen als auch in adulten Neuronen zu finden war. Versuche mit hCG führten sogar zu Nervenausprossungen. Dies geschah wahrscheinlich über die Beeinflussung der Neurosteroidsynthese, die für Nervenwachstum und – differenzierung verantwortlich ist (63). Sexualsteroid, die über den LHCGR reguliert werden [(63), (121)], sind auch für die Leydigzelldifferenzierung notwendig (121). Somit wäre eine möglicherweise über den LHCGR in der Harnblase induzierte Steroidproduktion für Wachstum und Differenzierung von Harnblasengewebe, d.h. zur Regeneration, denkbar und bedarf der weiteren Untersuchung. Andererseits könnte, wie von Apaja et al. in Ratten gezeigt wurde, das Nervenwachstum angeregt werden (63), sodass der LHCGR auf diese Weise an der Pathogenese von BPS/IC beteiligt sein könnte.

Da das Urothel bei BPS/IC beschädigt ist, ist es ein wichtiger Schritt in der Heilung der Krankheit oder Besserung der Beschwerden das Wachstum und die Differenzierung des Urothels voranzutreiben. Gemeinsam mit LH wirkt hCG an Differenzierung und Proliferation von Leydigzellvorstufen in funktionelle Leydigzellen im Hoden von Ratten mit. Die Hormone verstärkten die Expression des LHCGR in unreifen Leydigzellen und veränderten die Expressionshöhe der 5 dort nachgewiesenen Transkriptvarianten des Rezeptors. Damit ließ sich ebenfalls auf eine Funktion auch der trunkierten Rezeptoren in der Differenzierung der Leydigzellen schließen. Dabei bezogen sich einige Vermutungen auf eine unterstützende Rolle dieser trunkierten Varianten in der Präsentation der Liganden an den reifen Rezeptor, was bei anderen Rezeptoren wie dem TNF-Rezeptor schon bekannt ist (121). hCG ist darüber hinaus an der Differenzierung von Brustdrüsengewebe beteiligt [(61), (62)] und auch im

Endometrium wurde die differenzierende und proliferative, antiapoptotische Wirkung von hCG beschrieben (105). Zusätzlich scheint hCG auch die Vaskularisierung des Gewebes (105) über die Induktion von COX-2 und Prostaglandinen wie PGE₂ zu beeinflussen (90). Aufgrund dieser Eigenschaften von hCG und seinem Rezeptor, liegt die Vermutung nahe, dass es in der Harnblase ebenfalls differenzierende und wachstumsfördernde Aufgaben ausübt.

In diesem Zusammenhang sollte auch der cross-talk des LHCGR mit dem EGFR näher betrachtet werden. EGF als epithelialer Wachstumsfaktor (145) ist ein weiteres Indiz für die potentielle Wiederherstellung der urothelialen Integrität durch hCG und den LHCGR. In MA-10 Zellen konnte die Phosphorylierung und damit Aktivierung des EGFR durch LHCGR-induzierte lösliche Faktoren (93) oder auf Stimulierung mit hCG (103) beobachtet werden. Diese Transaktivierung war unabhängig von der Aktivierung von Gs-Proteinen und wurde über Fyn, eine Tyrosinkinase, vermittelt. Die Bedeutung dieser interzellulären Aktivierung zeigte sich z.B. im Ovar bei der Ovulation, indem der LHCGR die Induktion von EGF-like family members vermittelte (93). Die genauen Mechanismen der Transaktivierung von LHCGR und EGFR wurden jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt und schienen sich abhängig vom Zelltyp zu unterscheiden. Der intrazelluläre Aktivierungsweg umfasste cAMP- und nachfolgend PKA-Aktivierung und zeigte sich eher im Hoden. Dem gegenüber stand die extrazelluläre Aktivierung über membrangebundene „*EGFR activating ectodomains*“ wie HB-EGF oder Epiregulin, die eher im Ovar zu finden war (103). Damit vermittelten diese Faktoren auf parakrinem Weg LH-Wirkungen, die an der Oozytenreifung und Ovulation beteiligt waren, über den EGFR (142). Da HB-EGF bei BPS/IC erniedrigt ist [(46), (146)], könnte der cross-talk unterbunden und so die Regeneration des Urothels eingeschränkt sein.

Im Sinne eines negativen Feedbacks wurde der LHCGR durch EGF downreguliert. Dieser Mechanismus spielte sich aber wesentlich langsamer ab als die Downregulierung des LHCGR durch LH oder hCG. Denn hCG wirkte eher über verstärkte Rezeptorinternalisierung, während EGF die Rate des Rezeptoreinbaus in die Zellmembran (86) über verringerte Transkriptionsraten senkte (92). Da bei BPS/IC die Werte von EGF erhöht sind [(46), (146)], müsste die LHCGR-mRNA längerfristig verringert sein. Expressionsvergleiche des LHCGR in Urothelien bei beginnendem BPS/IC und bei länger bestehender Erkrankung könnten einen Unterschied in den mRNA-Leveln aufzeigen. Die immunhistochemischen Versuche zeigten zwar bei BPS/IC eine allgemein erhöhte Anzahl an Rezeptoren gegenüber der gesunden

Vergleichsgruppe, allerdings ist sie unabhängig von den Erkrankungsstadien der Patienten untersucht worden und nicht beweisend für das Vorliegen eines intakten Rezeptors. Mit Hilfe einer größeren Anzahl von Präparaten und einer (bisher noch nicht existierenden) einheitlichen Stadieneinteilung könnten zukünftig differenziertere Aussagen getroffen werden. Alles in allem scheint ein wichtiger Zusammenhang zwischen dem LHCGR, dem EGFR und dem Urothel bei BPS/IC zu existieren und dieser sollte weiter erforscht werden.

Obwohl der LHCGR in der Harnblase noch kaum untersucht ist, gibt uns sein Ligand, das hCG, doch einigen Aufschluss über mögliche Funktionen im Urothel. Seine β -Kette konnte bisher in Urothelzellkulturen (100) und im gesunden Urothel [(59), (107)] nachgewiesen werden. Zudem entfaltet es in Harnblasentumorzelllinien wachstumsfördernde Eigenschaften, die es als Holohormon nicht besitzt (100).

Immunhistochemische Untersuchungen zur Verteilung von β -hCG im Urothel wurden von Schwalenberg et al. durchgeführt. Dabei zeigte sich dessen Expression im gesunden Urothel beider Geschlechter in allen Zellschichten und verstärkt in den Umbrellazellen. Damit scheint eine wichtige Rolle für β -hCG im Urothel zu existieren, das möglicherweise an der Urothelintegrität beteiligt ist und als stabilisierender Faktor in anderen Epithelien wirken könnte. Durch die gemeinsame Expression von β -hCG und seinem Rezeptor im Urothel wird eine para – oder autokrine Stimulierung der Urothelzellen wahrscheinlich (59). Diese Art der Zellkommunikation vermuteten auch schon Hotakainen et al in Harnblasentumorzellen (107), obwohl der LHCGR dort nicht nachgewiesen werden konnte (60). Diese Untersuchungen sollten mit Hinblick auf die verschiedenen Rezeptorvarianten erneut erfolgen, zumal Zaravinos et al. 2011 die Rezeptorexpression des LHCGR mittels Mikroarrays in Harnblasentumoren nachweisen konnten (110).

Im Urothel von BPS/IC-Harnblasen war die Expression der β -Kette von hCG erhöht und es wurden zum gesunden Urothel differierende Isoformen nachgewiesen (59). Damit stand das in dieser Arbeit gezeigte Expressionsverhalten des LHCGR im Einklang, denn auch der Rezeptor wurde bei BPS/IC verstärkt exprimiert. Wie die für den LHCGR als Promoterüberaktivierung vermutete fehlerhafte Transkriptionsvielfalt (121), könnte auch das vermehrte hCG Ausdruck einer fehlerhaften Zellsteuerung sein. Damit bieten sich neue Therapiestrategien mit Substitution von intakten Hormon - oder Rezeptoreinheiten an (59).

Über ihren Rezeptor vermitteln hCG und LH die Produktion von Östrogenen und Progesteron (64). Beide Hormone waren in der Lage das Wachstum von Urothelzellkulturen zu fördern. Außerdem übten sie Einfluss auf Wachstumsfaktoren wie NGF, EGF und HB-EGF aus, die an der Pathophysiologie von BPS/IC beteiligt scheinen (147). Östrogen – und Progesteronrezeptoren waren im Urothel nachweisbar und schienen auch auf die Blasenfunktion zu wirken. So führte die Applikation von Östrogen zu höherer Blasenkapazität und Compliance und die Verteilung seines Rezeptors war bei verschiedenen Blasenfunktionsstörungen verändert (148). Bei Brustkrebs führte die Behandlung mit hCG u.a. zu geringeren Leveln an Östrogen- und Progesteronrezeptoren (149) und zeigte deren Regulierbarkeit über den Liganden des LHCGR. Über das im Urothel nachgewiesene hCG (59) könnte die Produktion von Östrogenen lokal in der Harnblase induziert werden und aufgrund der höheren Wirkkonzentration als im Blut eine Besserung des Urothelzustandes erreicht werden. Andererseits ist der Einfluss von Östrogen auf den LHCGR noch unklar. In der Promotorregion des LHCGR-Gens ist eine EREhs (*Estrogen receptor response element half site*) als cis- und transaktivierende Transkriptionsseite enthalten, die durch 3 *nuclear orphan receptors* entweder die Transkription des Rezeptors stimulieren oder reprimieren kann. Untersuchungen in PLC oder JAR-Zellen zeigten keinen Einfluss von Östrogen über diese EREhs auf die Transkriptionsrate des LHCGR [(150), (151)]. Da aber bekannt ist, dass sich transaktivierende Faktoren zwischen nicht-gonadalen Geweben unterscheiden (67), könnte man in der Harnblase dennoch eine mögliche Bindung von Östrogen an diese Transkriptionsseite untersuchen. Damit könnte ein Vergleich der Transkriptionsregulation von gesundem Urothel mit der wahrscheinlich veränderten Regulation bei BPS/IC ermöglicht werden.

4.6. Implikationen für therapeutische Anwendungen von hCG und LHCGR

Langfristiges Ziel dieser und anderer Studien zu hCG und seinem Rezeptor in der Harnblase ist die klinische Anwendung in der Therapie der BPS/IC. Ob dies durch verschiedene Isoformen von β -hCG als lokale Instillationstherapie oder über lösliche und trunkierte Varianten des LHCGR im Blutkreislauf verwirklicht werden kann, ist zum heutigen Zeitpunkt der Forschung noch völlig unklar. Andere Forschungsgruppen versuchten bereits Gebiete abzustecken, in denen die Anwendung des LHCGR oder von hCG nützlich sein könnte. Dazu

gab es Patentanmeldungen für hCG - Sprays bei *Asthma bronchiale* oder Implantate mit kontinuierlicher Freisetzung von hCG in der Harnblase zur Therapie von BPS/IC (152).

In der Behandlung der Epispadie konnten durch Applikation von hCG verbesserte Operationsbedingungen geschaffen werden. Es erhöhte die Expression von EGF, das durch seine Funktion in der Epithelregeneration in der Lage war die Penishaut zu verlängern (145). So könnte auch in der Harnblase der Effekt von hCG die Induktion von EGF sein und das beschädigte Urothel auf diese Weise der Regeneration zugeführt werden. Dazu wären weitere Untersuchungen zum Vorhandensein von EGF bei BPS/IC in Korrelation zur hCG-Verteilung, Stimulationsversuche an Urothelzellkulturen mit hCG bei gleichzeitiger Messung der EGF-Bildung und die Aufklärung der genauen zellulären Transduktion nötig.

Andere Autoren könnten sich einen Einsatz von hCG in der Infektionsprophylaxe vorstellen. Da einige Krankheitserreger die Oberflächenstrukturen von hCG und LH imitieren, können sie Zellen des Ovars oder des Hodens infizieren, die den LHCGR exprimieren. Eine Therapieoption besteht in der Applikation von hCG, um damit die Rezeptoren zu blockieren, sodass sich die Erreger nicht an der Zelloberfläche anheften können (67).

In der Tumorbekämpfung, speziell bei Harnblasentumoren, sind ebenfalls Einsatzmöglichkeiten denkbar, da AK gegen hCG das Zellwachstum dieser Zellen *in vitro* hemmen konnten (106). Allerdings schien diese Wirkung von hCG nicht über den LHCGR vermittelt zu sein, da der AK gegen den Teil des Hormons gerichtet ist, der nicht an den Rezeptor bindet und daher die Signaltransduktion nicht unterbrechen würde. Andererseits könnte eine Therapie mit hCG das Zellwachstum, also die Regeneration zerstörten Harnblasengewebes bei BPS/IC, stimulieren. Auch wenn für β -hCG die Aktivierung des LHCGR bislang nicht gezeigt werden konnte [(60), (153)], so könnte es doch an Rezeptorvarianten oder sogar intrazellulär binden und eine vom typischen Signalweg abweichende Aktivierung der Zellsysteme bewirken. Kopplungsexperimente und die Abhängigkeit der LHCGR-Aktivierung von der β -hCG-Konzentration in der Harnblase müssen zeigen, ob ein direkter Zusammenhang von Hormon und Rezeptor besteht oder andere Rezeptoren die Wirkung von β -hCG vermitteln. Über den Mannoserezeptor CD 206 (102), den Lektinrezeptor oder den TGF β -Rezeptor (106) wurde in anderem Zusammenhang schon spekuliert.

Erste Patentanmeldungen aus den USA schlagen für eine trunkierte (AS 1-450/470) lösliche Rezeptorvariante (50 kDa) des LHCGR im menschlichen Serum von Schwangeren vielfältige diagnostische und therapeutische Möglichkeiten vor. Beispielsweise war diese Variante noch fähig Liganden zu binden und konnte so die Konzentrationen von LH und hCG im Blut senken. Damit wäre sie möglicherweise nützlich bei Erkrankungen mit erhöhter Konzentration dieser Hormone. Für die Reifung der Oozyten oder die Ovulation ist das Zusammenspiel von LH und seinem Rezeptor entscheidend. Erhöhte Werte des löslichen Rezeptors könnten den freien Anteil des Hormons im Blut senken und diese entscheidenden Prozesse für die Entstehung einer Schwangerschaft behindern. Diese Rezeptorvariante könnte also einen Prediktor für schlechte Oozytenreifung darstellen, dem therapeutisch durch die Entwicklung von AK gegen den verkürzten LHCGR entgegen zu wirken wäre (154). Dieser könnte aber auch als Kontrazeptivum Verwendung finden (155). Chambers et al. benutzten die Konzentration dieses verkürzten Rezeptors, um den Therapieerfolg einer ovariellen Stimulation zur künstlichen Befruchtung einzuschätzen (126). Für den Einsatz von löslichen EZDs des LHCGR im Sinne eines funktionellen Antagonisten bestünde der Vorteil in der fehlenden agonistischen Wirkung bei hohen Wirkkonzentrationen, wie sie bei anderen Hormonantagonisten vorkamen (132). Diese EZDs oder lösliche Rezeptoranteile könnten als lokale Instillationstherapie in die Harnblasen dem Urothel leicht zugänglich gemacht werden und am Hauptort der Pathogenese wirken. Damit könnte die Konzentration und Wirkung von hCG über den LHCGR kontrolliert werden. Auch die bereits angesprochene vaskuläre Transzytose mittels Kopplung von Medikamenten an anti-LHCGR-AK (140) stellt einen weiteren Weg der therapeutisch möglichen Nutzung des LHCGR dar.

4.7. Ausblick

Es müssen noch zahlreiche Untersuchungen zum LHCGR in der Harnblase und anderen Teilen des Harntrakts erfolgen. Die Aufklärung seiner Funktionen und die molekularen Mechanismen sind die Voraussetzungen, um therapeutischen Nutzen aus dem LHCGR ziehen zu können. Beispielsweise nutzte der Rezeptor bei hohen Ligandenkonzentrationen (präovulatorisch, Schwangerschaft) andere Signalwege wie die Aktivierung von PLC über Gq-Proteine (79). Untersuchungen der aktivierten Signalkaskaden in gesunden und an BPS/C erkrankten Harnblasen könnten Aufschluss über Unterschiede zwischen physiologischer und pathologischer Funktion des LHCGR liefern. Denn höhere Konzentrationen von hCG in

BSP/IC-Blasen könnten über andere Signalwege auch andere Wirkungen des LHCGR vermitteln.

Die verschiedene subzelluläre Lokalisation des LHCGR in den gezeigten Verteilungsmustern könnte genauer durch Zelllysate bestimmter Kompartiment wie bei Bacich et al. untersucht werden. Sie zeigten die Expression bestimmter Splicevarianten des LHCGR mittels Western Blot im Zytosol und im Mikrosomen - nicht jedoch im Mitochondrienkompartiment unterschiedlicher Gewebe (122). Da viele Transkripte des Rezeptors vermutlich nicht translatiert oder nicht in die Zellmembran eingebaut werden und andererseits der Rezeptor auch über Internalisierung reguliert wird, bietet sich speziell das Endosomen-/Lysosomen- und Golgi-/ER-Kompartiment für genauere Untersuchungen. So könnte man die Internalisierungsraten zwischen gesunden und BPS/IC-Harnblasen vergleichen und Rückschlüsse auf die Anzahl der gebildeten unreifen Vorstufen oder trunkierten Varianten ziehen.

Zur weiteren Aufklärung einer generellen Funktion des LHCGR im Urothel, wie der Vermittlung der Epithelprotektivität von hCG, sind Studien an anderen Urotheldefekten wie dem *Carcinoma in situ*, der bakteriellen Zystitis oder der Strahlenzystitis hilfreich. Auch die Korrelation von hCG und LH im Serum zur Expressionshöhe des LHCGR im Urothel könnte zur Differenzierung der Rezeptorregulation (up – oder downregulation) aufschlussreich sein. Da gesunde männliche und weibliche Urothelien eine basale Rezeptorexpressionsrate zeigten, scheint der LHCGR das Potential zu einem Indikator für eine fehlende Urothelintegrität, bzw. für BPS/IC zu haben.

Da der LHCGR in Abhängigkeit von Gewebe und Tiermodell verschiedene Splicevarianten exprimiert und deren Eigenschaften und Regulationsmechanismen kontrovers diskutiert werden, muss die Übertragung auf den humanen LHCGR mit Vorsicht betrachtet werden. Darum sind weitere Untersuchungen an der menschlichen Harnblase unerlässlich für ein fundiertes Wissen über den Rezeptor, damit er therapeutisch nutzbar wird.

5. Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Vergleichende immunhistochemische Untersuchungen zum LH/hCG-Rezeptor (LHCGR) im Urothel und Detrusor der Harnblase mit Veränderungen bei Bladder Pain Syndrome/Interstitial Cystitis (BPS/IC)

eingereicht von:

Claudia Schulze, geb. Taube

angefertigt am:

Universitätsklinikum Leipzig

betreut von:

Priv.-Doz. Dr. rer. nat. habil. Jochen Neuhaus

Dr. med. Thilo Schwalenberg

Januar 2013

BPS/IC (*Bladder Pain Syndrome/Interstitial Cystitis*) ist ein sehr schweres und noch weitgehend unverstandenes Krankheitsbild in der Urologie. Viele Frauen sind im Alltag durch den ständigen Harndrang und die Schmerzen stark eingeschränkt und von Depressionen betroffen. Die Aufklärung der Pathogenese ist deshalb sehr wichtig, um eine adäquate Therapie für die Betroffenen zu entwickeln und die Krankheit möglichst frühzeitig diagnostizieren zu können. Das Schwangerschaftshormon hCG (humanes Choriongonadotropin) besitzt differenzierende und wachstumsfördernde Eigenschaften und eine Rolle in der Urothelregeneration und – stabilisierung scheint möglich. Daher ist das Ziel dieser Arbeit seinen Rezeptor, den LHCGR (*Luteinizing-Hormone/Choriogonadotropin Rezeptor*), in der Harnblase nachzuweisen und die urothelialen und muskulären Charakteristika zwischen gesunden und an BPS/IC erkrankten Harnblasen zu vergleichen. Die

Darstellung des LHCGR erfolgte auf Proteinebene mittels indirekter Immunfluoreszenz und auf mRNA-Ebene durch Standard-PCR. Es zeigten sich im Urothel von Harnblase und Ureter 5 unterschiedliche Verteilungsmuster des Rezeptors hinsichtlich seiner Expression in verschiedenen Zellschichten und seiner subzellulären Lokalisation. Je nach Urothelzustand und zwischen den Entitäten Kontroll- bzw. BPS/IC-Harnblase variierten diese Muster in ihrer Häufigkeit. In anderen Epithelien, wie dem Vaginalepithel, änderte sich die zelluläre Verteilung des LHCGR in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Zellen. Es scheint möglich, dass auch die Rezeptorexpression in Urothelzellen deren verschiedene Differenzierungszustände widerspiegelt. Dies unterstützt den für hCG vermuteten Einfluss auf die Epithelregeneration. Ein Vergleich der urothelialen Fluoreszenzintensitäten zwischen weiblichen Kontroll- und BPS/IC-Harnblasen zeigte eine signifikant stärkere Expression des Rezeptors bei erkrankten Patienten. Dem gegenüber war kein Unterschied im Detrusor, weder zwischen Kontroll- und BPS/IC-Harnblasen noch im geschlechtsspezifischen Vergleich, festzustellen. Damit scheint der Rezeptor seine Hauptaufgabe vorrangig im Urothel zu entfalten. Die Korrelationsanalysen ergaben keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Erkrankungsalter (Zeitpunkt der Diagnosestellung und Biopsieentnahme) und der LHCGR-Immunfluoreszenz. Ein endokrinologischer Einfluss auf die Rezeptorexpression wurde dadurch unwahrscheinlich und unterstützt die immer akzeptiertere Auffassung, dass BPS/IC nicht mehr mit der Menopause assoziiert ist. Neben dem Urothel und Detrusor zeigten auch Lamina propria und Gefäße von Harnblase und Ureter die Expression des LHCGR in der Immunhistochemie. Unterschiedliche Clustermuster des Rezeptors im Detrusor ließen auf die Oligomerisierung des Rezeptors schließen. Die Bedeutung dieser Zusammenschlüsse ist jedoch noch unklar, wobei unterschiedliche funktionelle Zustände des Rezeptors vermutet werden. Orientierung bieten andere Rezeptoren, die durch Dimerisierung verschiedener Rezeptorvarianten ihre Funktionalität verbessern oder verschlechtern konnten. Obwohl für keine bisher entdeckte Variante des LHCGR eine definitive Aufgabe ermittelt werden konnte, scheinen doch viele Varianten auch unterschiedliche Funktionen wahrnehmen zu können. Besonders auf der Regulierbarkeit des Rezeptors mittels interagierender Splicevarianten sollte das Augenmerk zukünftiger Studien liegen. Ob durch Komplexbildung verschiedener Varianten oder Bildung nichtfunktioneller trunkierter Rezeptoren, die Kontrollmöglichkeiten sind vielfältig und können auch auf Liganden wirken. Letztlich ließ der Nachweis des LHCGR in allen Schichten von Harnblase und Ureter eher eine globale Rolle des Rezeptors im Harntrakt des Menschen vermuten. Dazu passten auch die bereits

nachgewiesenen Einflüsse seiner Liganden auf die Blasenfunktion von Hunden. Die hier vorgelegte Arbeit untersuchte zum ersten Mal die Expression des LHCGR mittels PCR und Immunhistochemie in humanen Harnblasen und Ureteren. Dabei löste sie sich von den sonst üblichen Vorstellungen einer Beziehung des Rezeptors zu Blasentumoren, Schwangerschaft oder Inkontinenz. Diagnose und Therapie von BPS/IC sind zur Zeit noch ständigen Wandlungen unterworfen und dabei entgehen viele Patienten der (frühen) Diagnosestellung und einer adäquaten Behandlung. Diese Studie sollte dazu beitragen neue Einblicke in die Pathophysiologie der Erkrankung zu erlangen, um eine kausale Therapie entwickeln zu können. Zukünftig könnten diese Ergebnisse dabei helfen die Anwendung einer sensitiven und vor allem spezifischen Diagnostik auf molekularer Ebene (mRNA - oder Proteinnachweis) zu ermöglichen.

Literaturverzeichnis

1. Doggweiler-Wiygul R, MacDiarmid S. Interstitial cystitis. Female Patient. 2004;29:14–22.
2. Binder I, Van Ophoven A. [The complexity of chronic pelvic pain exemplified by the condition currently called interstitial cystitis. Part 1: Background and basic principles]. Aktuelle Urol. Mai 2008;39(3):205–14.
3. Hanno P, Lin A, Nordling J, Nyberg L, Van Ophoven A, Ueda T, u. a. Bladder Pain Syndrome Committee of the International Consultation on Incontinence. Neurourol. Urodyn. 2010;29(1):191–8.
4. Sant GR. Etiology, pathogenesis, and diagnosis of interstitial cystitis. Rev Urol. 2002;4 Suppl 1:S9–S15.
5. Brinkmann OA, Hertle L. Pathogenese der interstitiellen Zystitis - viele Hypothesen, aber Entstehung weiter unklar. Der Urologe A. November 2000;39(6):520–6.
6. Sant GR, Hanno PM. Interstitial cystitis: current issues and controversies in diagnosis. Urology. Juni 2001;57(6 Suppl 1):82–8.
7. Mishra N, Meijlink J. Interstitial cystitis in 2004 – Need for clarification. J. Eur. Urol Today. 2004;(15):10–1.
8. Warren JW, Meyer WA, Greenberg P, Horne L, Diggs C, Tracy JK. Using the International Continence Society's definition of painful bladder syndrome. Urology. Juni 2006;67(6):1138–1142; discussion 1142–1143.
9. Hanno PM, Chapple CR, Cardozo LD. Bladder pain syndrome/interstitial cystitis: a sense of urgency. World J Urol. Dezember 2009;27(6):717–21.
10. Van de Merwe JP, Nordling J, Bouchelouche P, Bouchelouche K, Cervigni M, Daha LK, u. a. Diagnostic Criteria, Classification, and Nomenclature for Painful Bladder Syndrome/Interstitial Cystitis: An ESSIC Proposal. European Urology. Januar 2008;53(1):60–7.
11. Fall M, Baranowski AP, Elneil S, Engeler D, Hughes J, Messelink EJ, u. a. EAU Guidelines on Chronic Pelvic Pain. European Urology. Januar 2010;57(1):35–48.
12. Hurst RE, Moldwin RM, Mulholland SG. Bladder defense molecules, urothelial differentiation, urinary biomarkers, and interstitial cystitis. Urology. April 2007;69(4 Suppl):17–23.
13. Parsons CL. The role of the urinary epithelium in the pathogenesis of interstitial cystitis/prostatitis/urethritis. Urology. April 2007;69(4 Suppl):9–16.
14. Hurst R, Roy J, Parsons C. The role of glycosaminoglycans in normal bladder

physiology and the pathophysiology of interstitial cystitis. In: Sant GR, editor. Interstitial Cystitis, Philadelphia (PA): Lippincott-Raven. 1997;93–100.

15. Interstitielle Zystitis. Ein schwieriges Krankheitsbild. *Ars Medici*. 2005;95(13):592–6.
16. Parsons CL, Zupkas P, Parsons JK. Intravesical potassium sensitivity in patients with interstitial cystitis and urethral syndrome. *Urology*. März 2001;57(3):428–432; discussion 432–433.
17. Nazif O, Teichman JMH, Gebhart GF. Neural Upregulation in Interstitial Cystitis. *Urology*. April 2007;69(4):S24–S33.
18. Toft BR, Nordling J. Recent developments of intravesical therapy of painful bladder syndrome/interstitial cystitis: a review. *Curr Opin Urol*. Juli 2006;16(4):268–72.
19. Sant GR, Kempuraj D, Marchand JE, Theoharides TC. The mast cell in interstitial cystitis: role in pathophysiology and pathogenesis. *Urology*. April 2007;69(4 Suppl):34–40.
20. Van De Merwe JP, Arendsen HJ. Interstitial cystitis: a review of immunological aspects of the aetiology and pathogenesis, with a hypothesis. *BJU International*. 1. Mai 2000;85(8):995–9.
21. Grover S, Srivastava A, Lee R, Tewari AK, Te AE. Role of inflammation in bladder function and interstitial cystitis. *Ther Adv Urol*. Februar 2011;3(1):19–33.
22. Oberpenning F, Van Ophoven A, Hertle L. Chronische interstitielle Zystitis. 2002;99(4):A 204–208.
23. Warren JW, Keay SK, Meyers D, Xu J. Concordance of interstitial cystitis in monozygotic and dizygotic twin pairs. *Urology*. Juni 2001;57(6 Suppl 1):22–5.
24. Renström Koskela L, Wik N. nitric oxide in the painful bladder/interstitial cystitis. *J Urol Urogynäkol*. 2007;14(1):18–9.
25. Neuhaus J, Weimann A, Stolzenburg J-U, Dawood W, Schwalenberg T, Dorschner W. Histamine receptors in human detrusor smooth muscle cells: physiological properties and immunohistochemical representation of subtypes. *World J Urol*. Juni 2006;24(2):202–9.
26. Neuhaus J, Schulte-Baukloh H, Stolzenburg J-U, Speroni di Fenizio P, Horn L-C, Rüffert H, u. a. Individual receptor profiling as a novel tool to support diagnosis of bladder pain syndrome/interstitial cystitis (BPS/IC). *World J Urol* [Internet]. 4. Oktober 2011 [zitiert 26. Februar 2012]; Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21969132>
27. Neuhaus J, Schwalenberg T, Schlichting N, Schulze M, Horn L-C, Stolzenburg J-U. [New methods of patient selection for improved anticholinergic therapy]. *Urologe A*. September 2007;46(9):1202–6.
28. Neuhaus J, Pfeiffer F, Wolburg H, Horn L-C, Dorschner W. Alterations in connexin expression in the bladder of patients with urge symptoms. *BJU Int*. September

2005;96(4):670–6.

29. Neuhaus J, Heinrich M, Schlichting N, Oberbach A, Fitzl G, Schwalenberg T, u. a. [Structure and function of suburothelial myofibroblasts in the human urinary bladder under normal and pathological conditions]. *Urologe A*. September 2007;46(9):1197–202.
30. Kliesch S. Epidemiologie der interstitiellen Zystitis. *Der Urologe A*. November 2000;39(6):527–9.
31. Parsons CL, Tatsis V. Prevalence of interstitial cystitis in young women. *Urology*. November 2004;64(5):866–70.
32. Novicki DE, Larson TR, Swanson SK. Interstitial cystitis in men. *Urology*. Oktober 1998;52(4):621–4.
33. Keay S, Warren JW. A hypothesis for the etiology of interstitial cystitis based upon inhibition of bladder epithelial repair. *Med. Hypotheses*. Juli 1998;51(1):79–83.
34. Ratner V, Slade D, Whitmore K. Interstitial cystitis: A bladder disease finds legitimacy. *Journal of Women's Health*. 1992;1(1):63–8.
35. Bogart LM, Berry SH, Clemens JQ. Symptoms of interstitial cystitis, painful bladder syndrome and similar diseases in women: a systematic review. *J. Urol.* Februar 2007;177(2):450–6.
36. Michael YL, Kawachi I, Stampfer MJ, Colditz GA, Curhan GC. Quality of life among women with interstitial cystitis. *J. Urol.* August 2000;164(2):423–7.
37. Forrest JB, Vo Q. Observations on the presentation, diagnosis, and treatment of interstitial cystitis in men. *Urology*. Juni 2001;57(6 Suppl 1):26–9.
38. Hanno PM. Interstitial cystitis-epidemiology, diagnostic criteria, clinical markers. *Rev Urol.* 2002;4 Suppl 1:S3–8.
39. Hanno P, Nordling J, Van Ophoven A. What is new in bladder pain syndrome/interstitial cystitis? *Curr Opin Urol.* Juli 2008;18(4):353–8.
40. Tomaszewski JE, Landis JR, Russack V, Williams TM, Wang LP, Hardy C, u. a. Biopsy features are associated with primary symptoms in interstitial cystitis: results from the interstitial cystitis database study. *Urology*. Juni 2001;57(6 Suppl 1):67–81.
41. Schwalenberg T, Neuhaus J, Horn L-C, Alexander H, Zimmermann G, Ho Thi P, u. a. [New insights in the differential diagnosis of bladder pain syndrome]. *Aktuelle Urol.* März 2010;41(2):107–18.
42. Ottem DP, Teichman JMH. What is the value of cystoscopy with hydrodistension for interstitial cystitis? *Urology*. September 2005;66(3):494–9.
43. Hanno PM, Burks DA, Clemens JQ, Dmochowski RR, Erickson D, Fitzgerald MP, u.

- a. AUA guideline for the diagnosis and treatment of interstitial cystitis/bladder pain syndrome. J. Urol. Juni 2011;185(6):2162–70.
44. Van De Merwe J, Nordling J. Interstitial cystitis: definitions and confusable diseases. ESSIC Meeting 2005 Baden. Eur Urol Today. März 2006;6,7,16,17.
45. Keay S, Zhang C-O, Shoenfelt JL, Chai TC. Decreased in vitro proliferation of bladder epithelial cells from patients with interstitial cystitis*. Urology. Juni 2003;61(6):1278–84.
46. Keay SK, Zhang CO, Shoenfelt J, Erickson DR, Whitmore K, Warren JW, u. a. Sensitivity and specificity of antiproliferative factor, heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor, and epidermal growth factor as urine markers for interstitial cystitis. Urology. Juni 2001;57(6 Suppl 1):9–14.
47. Kim SH, Kim TB, Kim SW, Oh S-J. Urodynamic findings of the painful bladder syndrome/interstitial cystitis: a comparison with idiopathic overactive bladder. J. Urol. Juni 2009;181(6):2550–4.
48. Binder I, Rossbach G, Van Ophoven A. [The complexity of chronic pelvic pain exemplified by the condition currently called interstitial cystitis. Part 2: Treatment]. Aktuelle Urol. Juli 2008;39(4):289–97.
49. Neuhaus J, Schwalenberg T. Intravesical treatments of bladder pain syndrome/interstitial cystitis. Nat Rev Urol. 13. November 2012;9(12):707–20.
50. Van Ophoven A. Therapie der Interstitiellen Zystitis mittels Blaseninstillationen. Journal für Urologie und Urogynäkologie. 2007;14(1):18–20.
51. Rössberger J, Fall M, Jonsson O, Peeker R. Long-term results of reconstructive surgery in patients with bladder pain syndrome/interstitial cystitis: subtyping is imperative. Urology. Oktober 2007;70(4):638–42.
52. Lewis SA. Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. American Journal of Physiology - Renal Physiology. 1. Juni 2000;278(6):F867 – F874.
53. Birder LA. Urinary bladder urothelium: Molecular sensors of chemical/thermal/mechanical stimuli. Vascular Pharmacology. Oktober 2006;45(4):221–6.
54. Slobodov G, Feloney M, Gran C, Kyker K, Hurst R, Culkin D. ABNORMAL EXPRESSION OF MOLECULAR MARKERS FOR BLADDER IMPERMEABILITY AND DIFFERENTIATION IN THE UROTHELIUM OF PATIENTS WITH INTERSTITIAL CYSTITIS. The Journal of Urology. April 2004;171(4):1554–8.
55. Birder L. Role of the urothelium in bladder function. Scand J Urol Nephrol Suppl. 2004;(215):48–53.

56. Moore CK, Goldman HB. The bladder epithelium and overactive bladder: what we know. *Curr Urol Rep*. November 2006;7(6):447–9.
57. Hauser PJ, Dozmorov MG, Bane BL, Slobodov G, Culkin DJ, Hurst RE. Abnormal expression of differentiation related proteins and proteoglycan core proteins in the urothelium of patients with interstitial cystitis. *J. Urol*. Februar 2008;179(2):764–9.
58. Lavelle JP, Meyers SA, Ruiz WG, Buffington CA, Zeidel ML, Apodaca G. Urothelial pathophysiological changes in feline interstitial cystitis: a human model. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. April 2000;278(4):F540–553.
59. Schwalenberg T, Stolzenburg J-U, Thi PH, Mallock T, Hartenstein S, Alexander H, u. a. Enhanced urothelial expression of human chorionic gonadotropin beta (hCG β) in bladder pain syndrome/interstitial cystitis (BPS/IC). *World J Urol* [Internet]. 30. August 2011 [zitiert 20. Januar 2012]; Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21877171>
60. Iles RK. Ectopic hCGbeta expression by epithelial cancer: malignant behaviour, metastasis and inhibition of tumor cell apoptosis. *Mol. Cell. Endocrinol*. 2. Januar 2007;260-262:264–70.
61. Lojun S, Bao S, Lei ZM, Rao CV. Presence of functional luteinizing hormone/chorionic gonadotropin (hCG) receptors in human breast cell lines: implications supporting the premise that hCG protects women against breast cancer. *Biol. Reprod*. November 1997;57(5):1202–10.
62. Lopez D, Sekharam M, Coppola D, Carter WB. Purified human chorionic gonadotropin induces apoptosis in breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2008;7(9):2837 –2844.
63. Apaja PM, Harju KT, Aatsinki JT, Petäjä-Repo UE, Rajaniemi HJ. Identification and structural characterization of the neuronal luteinizing hormone receptor associated with sensory systems. *J. Biol. Chem*. 16. Januar 2004;279(3):1899–906.
64. Pakarainen T, Ahtiainen P, Zhang F-P, Rulli S, Poutanen M, Huhtaniemi I. Extragonadal LH/hCG action--not yet time to rewrite textbooks. *Mol. Cell. Endocrinol*. 15. April 2007;269(1-2):9–16.
65. Takao Y, Honda T, Ueda M, Hattori N, Yamada S, Maeda M, u. a. Immunohistochemical localization of the LH/HCG receptor in human ovary: HCG enhances cell surface expression of LH/HCG receptor on luteinizing granulosa cells in vitro. *Mol. Hum. Reprod*. Juli 1997;3(7):569–78.
66. Minegishi T, Delgado C, Dufau ML. Phosphorylation and glycosylation of the luteinizing hormone receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. März 1989;86(5):1470–4.
67. Rao CV, Lei ZM. The past, present and future of nongonadal LH/hCG actions in reproductive biology and medicine. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 15. April

2007;269(1-2):2–8.

68. Dirnhofer S, Berger C, Hermann M, Steiner G, Madersbacher S, Berger P. Coexpression of gonadotropic hormones and their corresponding FSH- and LH/CG-receptors in the human prostate. *Prostate*. 15. Mai 1998;35(3):212–20.

69. Welle MM, Reichler IM, Barth A, Forster U, Sattler U, Arnold S. Immunohistochemical localization and quantitative assessment of GnRH-, FSH-, and LH-receptor mRNA Expression in canine skin: a powerful tool to study the pathogenesis of side effects after spaying. *Histochem Cell Biol*. Mai 2006;126(5):527–35.

70. Licht P, Von Wolff M, Berkholz A, Wildt L. Evidence for cycle-dependent expression of full-length human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor mRNA in human endometrium and decidua. *Fertility and Sterility*. März 2003;79(Supplement 1):718–23.

71. Dufau ML. THE LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR¹. *Annu. Rev. Physiol*. Oktober 1998;60(1):461–96.

72. Kero J, Poutanen M, Zhang FP, Rahman N, McNicol AM, Nilson JH, u. a. Elevated luteinizing hormone induces expression of its receptor and promotes steroidogenesis in the adrenal cortex. *J. Clin. Invest*. März 2000;105(5):633–41.

73. Abdallah MA, Lei ZM, Li X, Greenwold N, Nakajima ST, Jauniaux E, u. a. Human Fetal Nongonadal Tissues Contain Human Chorionic Gonadotropin/Luteinizing Hormone Receptors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1. Februar 2004;89(2):952–6.

74. Lei ZM, Mishra S, Zou W, Xu B, Foltz M, Li X, u. a. Targeted Disruption of Luteinizing Hormone/Human Chorionic Gonadotropin Receptor Gene. *Mol Endocrinol*. 1. Januar 2001;15(1):184–200.

75. Minegishi T, Nakamura K, Takakura Y, Miyamoto K, Hasegawa Y, Ibuki Y, u. a. Cloning and sequencing of human LH/hCG receptor cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 15. November 1990;172(3):1049–54.

76. Puett D, Li Y, Angelova K, Demars G, Meehan TP, Fanelli F, u. a. Structure-function relationships of the luteinizing hormone receptor. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. Dezember 2005;1061:41–54.

77. Puett D, Li Y, DeMars G, Angelova K, Fanelli F. A functional transmembrane complex: the luteinizing hormone receptor with bound ligand and G protein. *Mol. Cell. Endocrinol*. 2. Januar 2007;260-262:126–36.

78. McFarland KC, Sprengel R, Phillips HS, Köhler M, Rosemblyt N, Nikolics K, u. a. Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science*. 4. August 1989;245(4917):494–9.

79. Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr. Rev*. April 2002;23(2):141–74.

80. Dufau ML, Tsai-Morris CH, Hu ZZ, Buczko E. Structure and regulation of the luteinizing hormone receptor gene. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* Juni 1995;53(1-6):283–91.
81. Reinholz MM, Zschunke MA, Roche PC. Loss of alternately spliced messenger RNA of the luteinizing hormone receptor and stability of the follicle-stimulating hormone receptor messenger RNA in granulosa cell tumors of the human ovary. *Gynecol. Oncol.* November 2000;79(2):264–71.
82. LHCGR (luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor) [Internet]. [zitiert 9. September 2011]. Verfügbar unter: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/LHRID288.html>
83. Bradbury FA, Kawate N, Foster CM, Menon KM. Post-translational processing in the Golgi plays a critical role in the trafficking of the luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor to the cell surface. *J. Biol. Chem.* 28. Februar 1997;272(9):5921–6.
84. Munshi UM, Clouser CL, Peegel H, Menon KMJ. Evidence that Palmitoylation of Carboxyl Terminus Cysteine Residues of the Human Luteinizing Hormone Receptor Regulates Postendocytic Processing. *Mol Endocrinol.* 1. März 2005;19(3):749–58.
85. Galet C, Ascoli M. The differential binding affinities of the luteinizing hormone (LH)/choriogonadotropin receptor for LH and choriogonadotropin are dictated by different extracellular domain residues. *Mol. Endocrinol.* Mai 2005;19(5):1263–76.
86. Wang H, Segaloff DL, Ascoli M. Lutropin/choriogonadotropin down-regulates its receptor by both receptor-mediated endocytosis and a cAMP-dependent reduction in receptor mRNA. *J. Biol. Chem.* 15. Januar 1991;266(2):780–5.
87. Wang L, Gulappa T, Menon KMJ. Identification and characterization of proteins that selectively interact with the LHR mRNA binding protein (LRBP) in rat ovaries. *Biochim. Biophys. Acta.* Mai 2010;1803(5):591–7.
88. Zhang Y, Dufau ML. Repression of the luteinizing hormone receptor gene promoter by cross talk among EAR3/COUP-TFI, Sp1/Sp3, and TFIIB. *Mol. Cell. Biol.* Oktober 2003;23(19):6958–72.
89. Kühn B, Gudermann T. The luteinizing hormone receptor activates phospholipase C via preferential coupling to Gi2. *Biochemistry.* 21. September 1999;38(38):12490–8.
90. Banerjee P, Sapru K, Strakova Z, Fazleabas AT. Chorionic Gonadotropin Regulates Prostaglandin E Synthase via a Phosphatidylinositol 3-Kinase-Extracellular Regulatory Kinase Pathway in a Human Endometrial Epithelial Cell Line: Implications for Endometrial Responses for Embryo Implantation. *Endocrinology.* 2009;150(9):4326–4337.
91. Herrlich A, Kühn B, Grosse R, Schmid A, Schultz G, Gudermann T. Involvement of Gs and Gi proteins in dual coupling of the luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 12. Juli 1996;271(28):16764–72.
92. Hirakawa T, Galet C, Ascoli M. MA-10 cells transfected with the human

lutropin/choriogonadotropin receptor (hLHR): a novel experimental paradigm to study the functional properties of the hLHR. *Endocrinology*. März 2002;143(3):1026–35.

93. Shiraishi K, Ascoli M. A co-culture system reveals the involvement of intercellular pathways as mediators of the lutropin receptor (LHR)-stimulated ERK1/2 phosphorylation in Leydig cells. *Exp. Cell Res.* 1. Januar 2008;314(1):25–37.

94. Laue L, Wu SM, Kudo M, Hsueh AJ, Cutler GB Jr, Griffin JE, u. a. A nonsense mutation of the human luteinizing hormone receptor gene in Leydig cell hypoplasia. *Hum. Mol. Genet.* August 1995;4(8):1429–33.

95. Themmen APN, Verhoef-Post M. LH receptor defects. *Semin. Reprod. Med.* August 2002;20(3):199–204.

96. Wu SM, Leschek EW, Rennert OM, Chan WY. Luteinizing hormone receptor mutations in disorders of sexual development and cancer. *Front. Biosci.* 1. März 2000;5:D343–352.

97. Richter-Unruh A. Leydigzell-Hypoplasie und Testotoxikose — wenig bekannte Krankheitsbilder: Klinische und molekulare Grundlagen bei Vorliegen von Mutationen im LH-Rezeptor-Gen. *Dtsch Arztebl.* 2005;102(10):A 673–678.

98. Hirakawa T, Ascoli M. A constitutively active somatic mutation of the human lutropin receptor found in Leydig cell tumors activates the same families of G proteins as germ line mutations associated with Leydig cell hyperplasia. *Endocrinology*. September 2003;144(9):3872–8.

99. Pierce JG, Parsons TF. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* 1981;50:465–95.

100. Gillott DJ, Iles RK, Chard T. The effects of beta-human chorionic gonadotrophin on the in vitro growth of bladder cancer cell lines. *Br. J. Cancer.* Februar 1996;73(3):323–6.

101. Müller T, Gromoll J, Simoni M. Absence of exon 10 of the human luteinizing hormone (LH) receptor impairs LH, but not human chorionic gonadotropin action. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* Mai 2003;88(5):2242–9.

102. Tsampalas M, Gridelet V, Berndt S, Foidart J-M, Geenen V, Perrier d'Hauterive S. Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties. *J. Reprod. Immunol.* Mai 2010;85(1):93–8.

103. Evaül K, Hammes SR. Cross-talk between G protein-coupled and epidermal growth factor receptors regulates gonadotropin-mediated steroidogenesis in Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 10. Oktober 2008;283(41):27525–33.

104. Berger P, Sturgeon C, Bidart JM, Paus E, Gerth R, Niang M, u. a. The ISOBM TD-7 Workshop on hCG and related molecules. Towards user-oriented standardization of pregnancy and tumor diagnosis: assignment of epitopes to the three-dimensional structure of

diagnostically and commercially relevant monoclonal antibodies directed against human chorionic gonadotropin and derivatives. *Tumour Biol.* Februar 2002;23(1):1–38.

105. Zimmermann G, Ackermann W, Alexander H. Epithelial Human Chorionic Gonadotropin Is Expressed and Produced in Human Secretory Endometrium During the Normal Menstrual Cycle. *Biology of Reproduction.* 1. Mai 2009;80(5):1053–1065.

106. Delves PJ, Iles RK, Roitt IM, Lund T. Designing a new generation of anti-hCG vaccines for cancer therapy. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2. Januar 2007;260-262:276–81.

107. Hotakainen K, Haglund C, Paju A, Nordling S, Alfthan H, Rintala E, u. a. Chorionic gonadotropin beta-subunit and core fragment in bladder cancer: mRNA and protein expression in urine, serum and tissue. *Eur. Urol.* Juni 2002;41(6):677–85.

108. Odell WD, Griffin J. Pulsatile secretion of human chorionic gonadotropin in normal adults. *N. Engl. J. Med.* 31. Dezember 1987;317(27):1688–91.

109. Berger P, Gruschwitz M, Spoetl G, Dirnhöfer S, Madersbacher S, Gerth R, u. a. Human chorionic gonadotropin (hCG) in the male reproductive tract. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2. Januar 2007;260-262:190–6.

110. Zaravinos A, Lambrou GI, Boulalas I, Delakas D, Spandidos DA. Identification of Common Differentially Expressed Genes in Urinary Bladder Cancer. *PLoS ONE.* 4. April 2011;6(4):e18135.

111. Tao YX, Heit M, Lei ZM, Rao CV. The urinary bladder of a woman is a novel site of luteinizing hormone-human chorionic gonadotropin receptor gene expression. *Am. J. Obstet. Gynecol.* Oktober 1998;179(4):1026–31.

112. Coit VA, Dowell FJ, Evans NP. Neutering affects mRNA expression levels for the LH- and GnRH-receptors in the canine urinary bladder. *Theriogenology.* 15. Januar 2009;71(2):239–47.

113. Reichler IM, Welle M, Sattler U, Jöchle W, Roos M, Hubler M, u. a. Comparative quantitative assessment of GnRH- and LH-receptor mRNA expression in the urinary tract of sexually intact and spayed female dogs. *Theriogenology.* 1. April 2007;67(6):1134–42.

114. indirekte Immunfluoreszenz [Internet]. [zitiert 9. September 2011]. Verfügbar unter: http://www.univie.ac.at/mikroskopie/3_fluoreszenz/fluorochrome/4c_indirekteIF.htm

115. Willkommen bei der Carl Zeiss MicroImaging GmbH [Internet]. [zitiert 9. September 2011]. Verfügbar unter: <http://www.zeiss.de/C12567BE00459794/Contents-Frame/08DB90D12B7381C3C1256BB3002A38D5>

116. Ponglowhapan S, Church DB, Scaramuzzi RJ, Khalid M. Luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors and their transcribed genes (mRNA) are present in the lower urinary tract of intact male and female dogs. *Theriogenology.* 15. Januar 2007;67(2):353–66.

117. Bukovsky A, Indrapichate K, Fujiwara H, Cekanova M, Ayala ME, Dominguez R, u. a. Multiple luteinizing hormone receptor (LHR) protein variants, interspecies reactivity of anti-LHR mAb clone 3B5, subcellular localization of LHR in human placenta, pelvic floor and brain, and possible role for LHR in the development of abnormal pregnancy, pelvic floor disorders and Alzheimer's disease. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3. Juni 2003;1:46.
118. Rozzell TG, Wang H, Liu X, Segaloff DL. Intracellular retention of mutant gonadotropin receptors results in loss of hormone binding activity of the follitropin receptor but not of the lutropin/choriogonadotropin receptor. *Mol. Endocrinol.* Dezember 1995;9(12):1727–36.
119. Dickinson RE, Stewart AJ, Myers M, Millar RP, Duncan WC. Differential expression and functional characterization of luteinizing hormone receptor splice variants in human luteal cells: implications for luteolysis. *Endocrinology.* Juni 2009;150(6):2873–81.
120. Madhra M, Gay E, Fraser HM, Duncan WC. Alternative splicing of the human luteal LH receptor during luteolysis and maternal recognition of pregnancy. *Mol. Hum. Reprod.* August 2004;10(8):599–603.
121. Veldhuizen-Tsoerkan MB, Ivell R, Teerds KJ. hCG-induced changes in LH/CG receptor mRNA transcript levels in the testis of adult hypophysectomized, ethane dimethyl sulphonate-treated rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* Oktober 1994;105(1):37–44.
122. Bacich DJ, Earl CR, O'Keefe DS, Norman RJ, Rodgers RJ. Characterization of the translated products of the alternatively spliced luteinizing hormone receptor in the ovine ovary throughout the oestrous cycle. *Mol. Cell. Endocrinol.* 25. Januar 1999;147(1-2):113–24.
123. Minegishi T, Tano M, Abe Y, Nakamura K, Ibuki Y, Miyamoto K. Expression of luteinizing hormone/human chorionic gonadotrophin (LH/HCG) receptor mRNA in the human ovary. *Molecular Human Reproduction.* 1. Februar 1997;3(2):101–107.
124. Loosfelt H, Misrahi M, Atger M, Salesse R, Vu Hai-Luu Thi MT, Jolivet A, u. a. Cloning and sequencing of porcine LH-hCG receptor cDNA: variants lacking transmembrane domain. *Science.* 4. August 1989;245(4917):525–8.
125. Abell A, Liu X, Segaloff DL. Deletions of portions of the extracellular loops of the lutropin/choriogonadotropin receptor decrease the binding affinity for ovine luteinizing hormone, but not human choriogonadotropin, by preventing the formation of mature cell surface receptor. *J. Biol. Chem.* 23. Februar 1996;271(8):4518–27.
126. Chambers AE, Nayini KP, Mills WE, Lockwood GM, Banerjee S. Circulating LH/hCG receptor (LHCGR) may identify pre-treatment IVF patients at risk of OHSS and poor implantation. *Reprod Biol Endocrinol.* 23. Dezember 2011;9(1):161.
127. Lin CCJ, Clouser C, Peegel H, Menon B, Menon KMJ. The extracellular domain of luteinizing hormone receptor dictates its efficiency of maturation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 5. Dezember 2008;377(1):307–11.

128. Nakamura K, Yamashita S, Omori Y, Minegishi T. A splice variant of the human luteinizing hormone (LH) receptor modulates the expression of wild-type human LH receptor. *Mol. Endocrinol.* Juni 2004;18(6):1461–70.
129. Minegishi T, Nakamura K, Yamashita S, Omori Y. The effect of splice variant of the human luteinizing hormone (LH) receptor on the expression of gonadotropin receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2. Januar 2007;260-262:117–25.
130. Rodriguez MC, Xie YB, Wang H, Collison K, Segaloff DL. Effects of truncations of the cytoplasmic tail of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor on receptor-mediated hormone internalization. *Mol. Endocrinol.* März 1992;6(3):327–36.
131. Sánchez-Yagüe J, Rodríguez MC, Segaloff DL, Ascoli M. Truncation of the cytoplasmic tail of the lutropin/choriogonadotropin receptor prevents agonist-induced uncoupling. *J. Biol. Chem.* 15. April 1992;267(11):7217–20.
132. Osuga Y, Kudo M, Kaipia A, Kobilka B, Hsueh AJ. Derivation of functional antagonists using N-terminal extracellular domain of gonadotropin and thyrotropin receptors. *Mol. Endocrinol.* Oktober 1997;11(11):1659–68.
133. Környei JL, Lei ZM, Rao CV. Human myometrial smooth muscle cells are novel targets of direct regulation by human chorionic gonadotropin. *Biol. Reprod.* Dezember 1993;49(6):1149–57.
134. Bai M. Dimerization of G-protein-coupled receptors: roles in signal transduction. *Cell. Signal.* Februar 2004;16(2):175–86.
135. Kusuda S, Dufau ML. Characterization of ovarian gonadotropin receptor. Monomer and associated form of the receptor. *J. Biol. Chem.* 25. Februar 1988;263(6):3046–9.
136. Ji I, Lee C, Song Y, Conn PM, Ji TH. Cis- and trans-activation of hormone receptors: the LH receptor. *Mol. Endocrinol.* Juni 2002;16(6):1299–308.
137. Roess DA, Smith SML. Self-association and raft localization of functional luteinizing hormone receptors. *Biol. Reprod.* Dezember 2003;69(6):1765–70.
138. Roess DA, Horvat RD, Munnelly H, Barisas BG. Luteinizing hormone receptors are self-associated in the plasma membrane. *Endocrinology.* Dezember 2000;141(12):4518–23.
139. Yoshikawa T, Pardridge WM. Biotin delivery to brain with a covalent conjugate of avidin and a monoclonal antibody to the transferrin receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 1. November 1992;263(2):897–903.
140. Ghinea N, Mai TV, Groyer-Picard MT, Milgrom E. How protein hormones reach their target cells. Receptor-mediated transcytosis of hCG through endothelial cells. *J. Cell Biol.* April 1994;125(1):87–97.
141. Ghinea N, Milgrom E. A new function for the LH/CG receptor: transcytosis of

- hormone across the endothelial barrier in target organs. *Semin. Reprod. Med.* 2001;19(1):97–101.
142. Ashkenazi H, Cao X, Motola S, Popliker M, Conti M, Tsafiriri A. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. *Endocrinology*. Januar 2005;146(1):77–84.
143. Reinisch N, Sitte BA, Kähler CM, Wiedermann CJ. Human chorionic gonadotrophin: a chemoattractant for human blood monocytes, neutrophils and lymphocytes. *J. Endocrinol.* Juli 1994;142(1):167–70.
144. Shirai F, Kawaguchi M, Yutsudo M, Dohi Y. Human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes at the ovulatory period are in an activated state. *Mol. Cell. Endocrinol.* 31. Oktober 2002;196(1-2):21–8.
145. Makedonsky IA. The use of human chorionic gonadotropin (HCG) for penile reconstruction in bladder exstrophy and total epispadias patients. *Eur J Pediatr Surg.* Dezember 2006;16(6):428–31.
146. Zhang C-O, Li Z-L, Kong C-Z. APF, HB-EGF, and EGF biomarkers in patients with ulcerative vs. non-ulcerative interstitial cystitis. *BMC Urol.* 2005;5:7.
147. Erickson DR, Propert KJ. Pregnancy and interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *Urol. Clin. North Am.* Februar 2007;34(1):61–9.
148. Celayir S. Is there a 'bladder sex'? The relation of different sex hormones and sex hormone receptors in bladder in childhood. *Medical Hypotheses*. 59(2):186–90.
149. Janssens JP, Russo J, Russo I, Michiels L, Donders G, Verjans M, u. a. Human chorionic gonadotropin (hCG) and prevention of breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 15. April 2007;269(1-2):93–8.
150. Zhang Y, Dufau ML. Nuclear orphan receptors regulate transcription of the gene for the human luteinizing hormone receptor. *J. Biol. Chem.* 28. Januar 2000;275(4):2763–70.
151. Geng Y, Tsai-Morris CH, Zhang Y, Dufau ML. The human luteinizing hormone receptor gene promoter: activation by Sp1 and Sp3 and inhibitory regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24. September 1999;263(2):366–71.
152. ALEXANDER H, ZIMMERMANN G. MEDICAMENT FOR TREATING PROBLEMS RELATING TO FERTILITY AND PREGNANCY, AND AUTO-IMMUNE DISEASES, AND FOR INDUCING AN IMMUNOLOGICAL TOLERANCE IN TRANSPLANT PATIENTS, AND METHOD FOR PRODUCING SAID MEDICAMENT [Internet]. 2007 [zitiert 18. Januar 2012]. Verfügbar unter: <http://www.freepatentsonline.com/WO2007059761.html>
153. Butler SA, Ikram MS, Mathieu S, Iles RK. The increase in bladder carcinoma cell population induced by the free beta subunit of human chorionic gonadotrophin is a result of

-
- 102

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Leipzig, den 17.01.2013

.....

Lebenslauf:

Claudia Schulze, geb. Taube

Talstraße 15, 04103 Leipzig

Geb.datum/-ort: 05.01.1987 / Halle (Saale)

Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Nationalität: Deutsch

Schulischer Werdegang:

1993 - 1994	Grundschule Südpark (Halle/Saale)
1994 - 1997	Grundschule Lettin (Halle/Saale)
1997 - 1999	Sekundarschule Heide-Nord (Halle/Saale)
1999 - 2006	Giebichensteingymnasium „Thomas Müntzer“ (Halle/Saale)

Juli 2006: Abitur

Ausbildung:

Seit Okt. 2006	Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig
	Sept. 2008: 1. Staatsexamen (Physikum)
	-Praxisbezogener systematischer EKG-Kurs (Grund - und Aufbaukurs) am Uniklinikum Leipzig (WS 2009/2010 und SS 2010)
	-Praktikum „Anästhesie und Intensivmedizin“ am HELIOS Klinikum Erfurt (März 2010)

<u>Famulaturen:</u>	August 2009: Urologie
	Sept. 2009: Gastroenterologie/Hepatologie
	Feb. 2010: Kardiologie
	März 2011: Urologische Gemeinschaftspraxis Dr. Rothe/Dr. Jacob

Publikationen:

Schulze, C., Neuhaus, J., Alexander, H., Stolzenburg, JU., Schwalenberg T.

Nachweis des LH-Rezeptors (LHR) im Urothel und Veränderungen der Expression bei Interstitieller Zystitis (IC).

9th Research Festival for Life Sciences Leipzig 2010

Danksagung:

Ich möchte Herrn Dr. Thilo Schwalenberg dafür danken, dass er mich an diese sensible Krankheit herangeführt und mir die vorliegende Doktorarbeit vermittelt hat. Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei meinem Betreuer Herrn Dr. habil. Jochen Neuhaus für die vielen Anregungen während des Arbeitsprozesses und die entgegengebrachte Geduld bei unseren Besprechungen. Vielen, vielen Dank an Frau Annett Weimann und Frau Mandy Berndt für die Hilfe und Unterstützung bei der Erlernung der Methoden und die vielen schönen Gespräche zwischendurch. Außerdem möchte ich Herrn Dr. Frank Gaunitz für seine Ideen und Gedanken zum Primerdesign danken. Vergessen werden sollen auch nicht Herr Dr. Schulte-Baukloh, der freundlicherweise seine Präparate bereitgestellt hat und Frau Konstanze Büttner für die Sequenzierung der cDNAs. Ich möchte mich auch bei meinen Eltern und Schwiegereltern bedanken, weil sie mir dieses Studium ermöglicht haben, mich immer unterstützen und stets ein offenes Ohr für mich haben. Der größte Dank gilt meinem Mann für die zahlreichen Stunden, in denen er Rücksicht nehmen und den Haushalt führen musste und für sein großes Verständnis und die vielen Aufmunterungen in der langen Zeit dieser Arbeit. Meiner Tochter Josi danke ich dafür, dass es sie gibt.

Leipzig, den 17.01.2013